

DAYANE KARINA LORENZETTI

**INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA NO
DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS NO
LEITE CRU DE DOIS ESTADOS DA REGIÃO SUL**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para à obtenção do grau
de Mestre.**

Orientador: Prof. Dr. Giovani Mocelin

CURITIBA

2006

Aos meus pais Faustino e Margarida, a meu namorado Rodrigo e as minhas amigas Ediana e Jocilene. Por todo o apoio, palavras de incentivo e amor, vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Giovani Mocelin, pela orientação nesta dissertação, por todo apoio ao longo do curso.
- Ao Prof. Henrique Soares Koehler, pela co-orientação nesta dissertação, meus sinceros agradecimentos.
- À Indústria de laticínios pesquisada, por toda a receptividade encontrado na fábrica desde o início deste projeto, pelas informações cedidas, ao suporte técnico prestado, para que se tornasse possível a realização deste trabalho.
- Aos técnicos do laboratório e do controle de qualidade do laticínio, agradecimento especial pela colaboração e ajuda.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 JUSTIFICATIVA.....	11
1.1.1 Importância da pesquisa.....	11
1.1.2 Fatores que determinaram à escolha do Tema	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1 LEITE: ALIMENTO PRIMORDIAL	14
3.2 LEITE: ALIMENTO ESTRATÉGICO.....	16
3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE	18
3.3.1 Resíduos de antibióticos em leite	18
3.3.2 Acidez titulável do leite.....	19
3.3.3 Estabilidade térmica do leite através da graduação do álcool	21
3.3.4 Crioscopia do leite.....	23
3.3.5 Redutase do leite	24
3.3.6 Temperatura de transporte e granelização do leite.....	25
3.3.7 Contagem de células somáticas no leite	27
3.3.8 Gordura do leite	28
3.4 MICRORGANISMOS NO LEITE	30
3.4.1 Microrganismos psicrotróficos no leite	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL	38
4.2 MÉTODOS	39
4.2.1 Pesquisa de antibiótico no leite.....	39
4.2.2 Determinação da acidez titulável do leite.....	39
4.2.3 Método de análise para determinar a estabilidade térmica do leite através da graduação do álcool.....	39
4.2.4 Determinação do ponto crioscópico do leite	40
4.2.5 Determinar a redutase do leite cru	40
4.2.6 Medição da temperatura	40
4.2.7 Determinação da contagem de células somáticas (CCS)	40
4.2.8 Determinação da gordura do leite	41
4.2.9 Determinação da contagem de microrganismos psicrotróficos em petrífilm	41
4.2.10 Temperatura x tempo de estocagem	42
4.3 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO.....	42

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS REGIÕES 1 E 2.....	44
5.2 TEMPERATURA x TEMPO DE ESTOCAGEM.....	55
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
AUP	autorização de uso de produto
Cél.	Células
CCS	contagem de células somáticas
CGI	Coordenação Geral de Inspeção do Ministério da Agricultura
d.C.	depois de Cristo
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IN 51	Instrução Normativa 51
LMR'S	Limites máximos recomendados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	mililitros
mol/L	quantidade de soluto na solução por litro
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
rpm	rotações por minuto
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFC	unidade formadora de colônia
UHT	Ultra High Temperature
°C	graus Celcius
°D	graus Dornic
°GL	graus Gay Lussac
°H	graus Hortvert
μL	micro litro
m/v	massa por volume

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ACIDEZ, ÁLCOOL, CRIOSCOPIA, REDUTASE, TEMPERATURA, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, PORCENTAGEM DE GORDURA E PSICOTRÓFICOS ENTRE AS DUAS REGIÕES ESTUDADAS.....	33
TABELA 2 - RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS DUAS REGIÕES ESTUDADAS PARA ACIDEZ, ÁLCOOL, CRIOSCOPIA, REDUTASE, TEMPERATURA, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, PORCENTAGEM DE GORDURA E PSICOTRÓFICOS.....	34
TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS ANALISADOS TEMPO x TEMPERATURA DE ESTOCAGEM.....	45
TABELA 4 - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES DAS MÉDIAS DA VARIÁVEL x (UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS POR ML) QUANDO SUBMETIDAS A INTERAÇÃO DOS FATORES C (TEMPO) E B (TEMPERATURA) PARA A REGIÃO 1 (CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA)	45
TABELA 5 - RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES DAS MÉDIAS DA VARIÁVEL x (UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS POR ML) QUANDO SUBMETIDAS A INTERAÇÃO DOS FATORES C (TEMPO) E B (TEMPERATURA) PARA A REGIÃO 2 (ALTO VALE DE SANTA CATARINA).....	47

RESUMO

Na indústria de laticínios, onde grandes volumes de leite ficam armazenados a temperatura de refrigeração entre 1 a 6°C por longos períodos, as bactérias psicotróficas encontram condições ótimas para o seu desenvolvimento, e podem provocar mudanças indesejáveis no leite e nos seus derivados. A presença desses microrganismos indica a baixa qualidade do leite e condições sanitárias insatisfatórias no processamento. Este estudo conduzido em um laticínio situado na região metropolitana de Curitiba teve como objetivo pesquisar as características do leite cru captado em duas regiões: região metropolitana de Curitiba e na região do Alto Vale de Santa Catarina. Foram efetuadas as análises de acidez, resistência ao álcool, crioscopia, redutase, temperatura de chegada deste leite, contagem de células somáticas, teor de gordura e contagem de microrganismos psicotróficos. O leite de ambas as regiões foi submetido a três períodos de estocagem de 4, 20 e 36 horas após recebimento e a três temperaturas de estocagem de 1, 3 e 6°C, para determinar a condição mais adequada que minimizasse a multiplicação de microrganismos psicotróficos durante a estocagem do leite no laticínio. Nas análises foram observadas diferenças estatísticas em todas as duas regiões, com exceção da contagem de células somáticas. Foi possível verificar que o leite das duas regiões difere entre si nas características de qualidade principalmente quanto as análises de resistência ao álcool, redutase, temperatura e contagem de microrganismos psicotróficos. Ao submeter o leite de ambas as regiões a tempos e temperaturas de estocagem diferentes obteve-se resultados que demonstraram que mesmo sob temperatura de refrigeração os microrganismos psicotróficos continuam a desenvolver-se, sugerindo que um tempo mínimo de estocagem deve ser perseguido como meta. Constatou-se ainda que as contagens iniciais de microrganismos psicotróficos apresentam-se altas no momento da chegada da matéria-prima na indústria beneficiadora, podendo resultar em sérios problemas nos produtos lácteos produzidos neste laticínio.

Palavras-chaves: leite, microrganismos, psicotróficos.

ABSTRACT

The storage of large volumes of raw milk in the dairy industry at temperatures between 1 and 6° C favors psychrotrophic bacteria development and may result in undesirable changes in the milk itself and milk products. The bacteria presence indicates that unsatisfactory conditions occur during the whole process of handling the milk from milking to the arrival at the dairy industry. This study was carried out with the raw milk collected at two different areas in South Brazil, the first one was in Curitiba and its adjacencies and the second one was a region named Alto Vale in Santa Catarina State. The first experiment comprehended the determination of eight different variables of raw milk from both regions. This profile comprised of acidity, resistance to ethanol, cryoscopy, reductase, milk temperature, somatic cells counting, psychrotrophic bacteria counting and fat content. The second experiment analyzed the effects of three different periods of storage (4, 20 and 36 hours) at three different temperatures (1, 3 and 6° C) on the psychrotrophic bacteria population development. Statistical analyses revealed differences among all variables studied, but somatic cells counting. Among statistical differences, some of them like resistance to ethanol, reductase and psychrotrophic bacteria counting showed that Curitiba and its adjacent area present superior raw milk quality. The second experiment demonstrated that psychrotrophic bacteria population counting increased at all temperatures and periods of storage studied. This development may further on lessen the quality of milk products from this dairy industry. At the actual refrigeration conditions since milking to the arrival at the dairy industry the time of storage of raw material should be the shortest one.

Key-words: milk, microorganisms, psychrotrophic

1 INTRODUÇÃO

O leite obtido a partir do úbere saudável sob condições sanitárias e com a aplicação de boas práticas higiênicas contém relativamente poucos microrganismos, mas pode tornar-se contaminado pelo homem tanto no momento da ordenha quanto nas demais ações executadas durante todo o seu processamento. O leite cru se constitui em um excelente meio nutritivo para o crescimento de microrganismos, tornando-se sensível tanto à deterioração microbiana quanto ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos.

A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial que ocorre logo após a ordenha e com o binômio tempo/temperatura em que o mesmo permanece desde a ordenha até o seu processamento na indústria. No momento do recebimento nos laticínios, mesmo em temperaturas de 7°C ou inferior, os microrganismos psicrotróficos encontram condições favoráveis para o seu desenvolvimento e podem tornar-se dominantes na microbiota do leite.

Os grupo de microrganismos denominados psicrotróficos mesmo em temperaturas inferiores a 10°C encontram um ambiente favorável para sua multiplicação. O termo microrganismo psicrotrófico na área de laticínios refere-se a diferentes gêneros de bactérias capazes de um considerável crescimento no leite e em produtos lácteos, mesmo nas temperaturas de refrigeração entre 2°C até 10°C, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. Esse grupo, além do crescimento substancial é capaz de produzir enzimas que podem causar alterações negativas nas propriedades do leite. Essas enzimas, lipases e proteases, não são facilmente destruídas pelos processos térmicos a que o leite é submetido. Por serem consideradas termorresistentes, mesmo em baixas concentrações a ação dessas enzimas podem levar ao sabor amargo e rançoso tanto no leite quanto nos demais produtos lácteos estocados sob refrigeração. Essas lipases e proteases estão relacionadas a perdas de qualidade em leite UHT durante período de estocagem. Essas perdas aparecem como defeitos sensoriais, geleificação, instabilidade térmica do leite e redução no rendimento na produção de queijos.

Consequentemente, a determinação das características físico-químicas e microbiológicas do leite no momento do seu recebimento na indústria e os efeitos do binômio tempo e temperatura de estocagem são relevantes no processo de seleção do destino dessa matéria-prima, assim como, das medidas profiláticas e preventivas a serem tomadas para a melhoria da qualidade.

1.1 JUSTIFICATIVA

1.1.1 Importância da pesquisa

Por tratar-se de um produto perecível, o leite merece atenção especial na sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo, pois estará sempre sujeito a uma série de alterações (FURTADO *et al.*, 2004).

Do ponto de vista biológico, o leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos por apresentar, entre outras características, alto teor de proteínas e sais minerais (BORGES *et al.*, 1989). Também é um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários grupos de microrganismos que nele encontra condições ótimas de multiplicação (ZOCHE *et al.*, 2002).

Esses grupos de microrganismos presentes no leite podem ser parcial e/ou quase que totalmente eliminados pelos processos de pasteurização e/ou esterilização comercial. A destruição de grupos patogênicos torna o leite mais seguro, eliminando potenciais riscos de infecção, mas não corrige defeitos relacionados ao sabor, à composição ou a adequação para a industrialização. Os processos térmicos são também insuficientes para inativar a maioria dos resíduos de drogas, como antibióticos e toxinas microbianas, principalmente as dos psicrotróficos, se estiverem presentes no leite. Desde 1972, a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e a Alimentação) reconhece que a pasteurização não se constitui em um método de melhora da qualidade do leite (GUIMARÃES, 1998).

Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, principalmente pela sua contaminação por bactérias

psicrotróficas formadoras ou não de esporos, que apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas lipolíticas e proteolíticas que rapidamente alteram o produto (BISHOP e WHITE, 1998; CRAVEN e MACAULEY, 1993).

Os microrganismos psicrotróficos são um grupo importante presente na indústria de leite sob o ponto de vista da deterioração e com a adoção da refrigeração do leite desde a ordenha até seu recebimento nos laticínios, a substituição da microbiota de bactérias mesofílicas produtoras de ácido láctico por uma microbiota psicrotrófica produtora de enzimas tem sido favorecida e tem levado a diferentes alterações na qualidade do leite e de seus derivados (ALMEIDA, 1998; GUIMARÃES, 1998).

1.1.2 Fatores que determinaram à escolha do Tema

Com a publicação da Instrução Normativa 51 (IN 51) (BRASIL, 2002) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 18 de setembro de 2002 que entrou em vigor em 1º de julho de 2005 nas regiões sul, sudeste e centro-oeste tornou-se obrigatória a coleta do leite cru já resfriado nas granjas leiteiras, isto levou a ênfase na preocupação com o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos desde a ordenha até sua industrialização.

O conhecimento de como os parâmetros tempo e temperatura influenciam o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru durante a sua estocagem em um laticínio da região metropolitana de Curitiba tornou-se relevante, pois vários trabalhos demonstraram que mesmo sob refrigeração, esses microrganismos continuam a desenvolver-se.

Para uma melhor compreensão tanto das características do leite cru que chega na indústria quanto do papel da temperatura e tempo de estocagem dessa matéria-prima, o trabalho foi dividido em duas etapas. Na 1ª etapa, foram efetuadas as análises físico-químicas exigidas pelo MAPA e uma análise microbiológica para o leite cru no momento de chegada da matéria-prima no laticínio. Na 2ª etapa, foram avaliados diferentes tempos de estocagem e temperaturas no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar as características do leite cru das bacias leiteiras de um laticínio situado na região metropolitana de Curitiba e estudar a influência das variáveis tempo e temperatura no crescimento populacional dos microrganismos psicrotróficos durante a estocagem.

2.2 Objetivos específicos

- I. Determinar as características do leite cru das duas regiões onde o laticínio capta sua matéria-prima.
- II. Determinar a contagem inicial de microrganismos psicrotróficos no momento do recebimento do leite cru na indústria beneficiadora.
- III. Identificar tempo e temperatura de estocagem que minimizem o crescimento populacional de microrganismos psicrotróficos durante estocagem no laticínio.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LEITE: ALIMENTO PRIMORDIAL

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002).

Para contar a história do leite, é preciso recuar muito além da existência humana e fixar-se em acontecimentos ocorridos há 220 milhões de anos: o aparecimento dos mamíferos. Percorrer a partir daí uma extraordinária saga, com diversos momentos cruciais que conduziram esses animais à situação atual: a hegemonia do planeta. Não podemos deixar de assinalar os aspectos que diferenciam o leite tão profundamente na alimentação, a ponto de elevá-lo ao “status” de um alimento primordial (CTENA e PIROLI, 1999).

O consumo do leite de outros mamíferos como alimento de uso geral – não exclusivo para recém nascidos – é outro fato civilizatório importante da espécie humana. Existem evidências da utilização do leite desde os primórdios da história (SOLER, 1998). Arqueólogos encontraram sinais da existência de ordenha de vacas para obtenção de leite há 9000 anos atrás (ROQUE *et al.*, 2003). Os primeiros registros que mencionam o leite aparecem nos escritos dos sumérios (4000 a.C.), posteriormente nos registros dos babilônicos (2000 a.C.) e também em documentos dos reinos védicos (PEREDA, 2005). O povo hebreu menciona o leite como o símbolo da fertilidade e entre os egípcios e gregos que o consideravam mais do que um alimento, a ele foi atribuído significado terapêutico (CTENA e PIROLI, 1999). Laticínios estavam entre as fontes de proteínas animais dos egípcios na antigüidade. A partir do leite dos bovinos, mas principalmente de caprinos e ovinos, os egípcios produziam manteiga e queijos, dos quais foram encontrados restos dentro de jarros cilíndricos colocados nas tumbas de Abidos, da época da primeira dinastia (BRESCIANI, 1998).

O médico grego Hipócrates, que viveu no final do século V a.C., dá-nos uma lista minuciosa dos alimentos utilizados na Grécia em seu texto chamado o Regime. Entre eles um alimento muito consumido pelos gregos na época, chamado *maza* (cevada pré-cozida e misturada com água, óleo, mel ou leite e amassada cuidadosamente) indica como o leite já era apreciado e consumido pelos gregos (AMOURETTI, 1998). A península helênica, muito montanhosa, praticamente sem rios e com poucas planícies, se prestava à criação de cabras e ovelhas, tendo os seus leites e queijos muito consumidos pelos gregos (FRANCO, 2001).

Na Ásia Menor, devido às suas propriedades hidratantes, o leite junto com pomadas e ungüentos, era utilizado em doenças de pele. Também Pompéia, esposa do imperador romano Nero (37-68 d.C.) costumava tomar longos banhos com leite de jumentas, acreditando em sua ação rejuvenescedora. A rainha egípcia Cleópatra, por volta da mesma época, cultivava hábito semelhante (FRANCO Jr., 2001).

No Império Romano, a transformação do leite em queijo tinha sua tecnologia bem conhecida, como demonstram os escritos do século I de Plínio, de Varro e, sobretudo, de Columella em seu tratado *De Re Rustica* (PEREDA, 2005).

A história é repleta de indicações do nosso profundo vínculo com o leite, um alimento duplamente primordial. Primeiro, no plano individual, pois representa em cada um de nós a primeira experiência degustativa e a primeira relação com o mundo (CTENA e PIROLI, 1999).

Mas, em outros períodos da história, o leite passou a ter uma imagem negativa devido aos problemas sanitários da época, com os romanos designando bárbaros aqueles povos que consumiam somente carne e leite, em contraposição aos civilizados, que consumiam produtos com maior grau de elaboração, como vinho e azeite de oliva (FRANCO Jr., 2001). A transformação do leite em queijo tornou-se uma prática frequente, pois o consumo do leite cru passou a ser considerada uma barbárie alimentar e raros eram aqueles que possuíam este hábito no século XI (MONTANARI, 1998).

Na China e no Japão sempre houve preconceito contra o leite e os laticínios. Parecia estranho nessas culturas que seres humanos desmamados continuassem alimentando-se de leite. Em alguns países mediterrâneos de cozinha à base de azeite,

acreditava-se, até o século XVIII, que a manteiga causava lepra, enfermidade de incidência bem maior nos países do norte da Europa, grandes consumidores de leite e laticínios (FRANCO Jr., 2001).

A introdução do café na Europa usou como veículo o leite. No século XVII, a mistura de café com leite era popular, enquanto as classes mais abastadas preferiam o café puro. Tal hábito continuaria no século seguinte. Registros da chocolateria real Le Grand d'Aussy informam que, em Paris, por volta de 1720, havia 380 estabelecimentos que vendiam a mistura café com leite. No fim do século XVIII, esse número aumentou para mais de 600 (TETRA PAK, 2005).

Há muitos relatos em textos antigos da Europa Ocidental entre os séculos XV e XVIII, onde os camponeses são denominados bebedores de leite, de soro de leite e tabefe, subprodutos ligados à fabricação do queijo e da manteiga. Mas são poucos os dados que permitem precisar os lugares onde esses laticínios foram realmente importantes na dieta camponesa. Possivelmente, nas regiões mais produtoras de leite, queijo e manteiga, como a Bretanha, a Normandia e a região rural flamenga (FLANDRIN, 1998).

3.2 LEITE: ALIMENTO ESTRATÉGICO

A partir do século XX, com a criação da Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu-se como recomendação o consumo per capita médio anual de 175 litros. O consumo médio, em equivalentes litros de leite, nos países ricos ocidentais, na Argentina e no Uruguai, é superior a 200 litros por habitante/ano. No Brasil, o consumo per capita médio é inferior a 130 litros/ano, abaixo do preconizado pela OMS (MARTINS, 2004).

A legislação de alimentos teve início com as primeiras civilizações e incluía a proibição de consumo da carne de animais que morriam de outras causas que não o seu abate. Existem vários regulamentos alimentares que recomendam a utilização dos alimentos através da história, desde a Idade Média e Revolução Industrial até os séculos XIX e XX. Com o estabelecimento das legislações modernas nas nações desenvolvidas geralmente com implicações internacionais os regulamentos para a produção e transformação do leite são mais rigorosos (ICMSF, 1997).

As condições físico-químicas do leite envolvem diversos parâmetros, que devem ser estudados em laboratório para a determinação de sua qualidade, revelando fenômenos deterioradores e processamento inadequado. As maiores preocupações quanto à qualidade físico-química do leite estão associadas ao estado de conservação e à eficiência do seu tratamento térmico e integridade físico-química, principalmente relacionada à adição ou remoção de substâncias químicas próprias ou estranhas à sua composição (TINÔCO *et al.*, 2002a).

No Brasil, o leite “in natura” apresenta baixa qualidade quando comparado a outros países mais desenvolvidos, sendo que este fator está relacionado com a influência das estações do ano, as práticas de produção e manuseio na fazenda, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e a distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria. Além dos fatores anteriores, também contribuem para a presença e o desenvolvimento de microrganismos contaminantes no leite: a qualidade bacteriológica das águas, qualidade do ar dos estábulos, sanidade dos ordenhadores e dos animais e principalmente, utensílios não perfeitamente higienizados (HUHN *et al.*, 1980).

Mas o setor leiteiro brasileiro vem passando por um intenso processo de modernização com significativas mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte do leite, visando à melhora na qualidade do produto nacional. Nos últimos anos, tem-se observado a adoção acelerada de programas de resfriamento do produto na fazenda após a ordenha, com posterior coleta e transporte do leite em caminhões-tanque isotérmicos. Estas duas medidas vêm sendo amplamente incentivadas pelos laticínios, uma vez que há considerável aumento na qualidade do leite e derivados quando o leite é refrigerado na fazenda, em comparação com o leite não refrigerado coletado em latões, também se observa uma economia significativa de recursos financeiros com o transporte a granel (SANTOS e FONSECA, 2003).

A produção de leite cresceu a uma taxa média de 4,5% ao ano na última década, passando de 15,6 bilhões de litros, em 1993, para 22,6 bilhões de litros, em 2002. O Brasil é o sexto maior produtor de leite, com um volume que corresponde a aproximadamente 4,5% da produção mundial. O setor é um dos mais importantes do agronegócio brasileiro, ocupando o sexto lugar em valor bruto da produção agropecuária

(IBGE, 2002). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2002), os estados que mais produzem leite são, respectivamente, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo.

Especificamente, no mercado de leite fluido observamos nos últimos anos, crescimento explosivo do consumo de leite tipo UHT, tornando tecnologicamente possível o fornecimento de leite vindo de regiões distantes dos centros consumidores a preços baixos (SANTOS e FONSECA, 2003).

Destaca-se então a atuação da tecnologia de alimentos, que cada vez mais tem adaptado o leite de outras espécies às necessidades do ser humano, criando produtos para cada idade e para cada fase da vida. A única exceção fica por conta do leite materno, que não necessita de nenhuma tecnologia ou ciência para ser o melhor leite para a criança nos dois primeiros anos de vida (CTENA e PIROLI, 1999).

3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

3.3.1 Resíduos de antibióticos em leite

Definem-se antibióticos como compostos químicos específicos produzidos por microrganismos, tais como os fermentos (bolors), fungos e bactérias que possuem ação bacteriostática ou bactericida, fungistática ou fungicida (ENGLERT, 1982; BRASIL, 1999).

Os antibióticos são importantes fármacos utilizados em animais destinados à produção de alimentos, com a finalidade terapêutica, profilática ou como promotores de crescimento (CANA BRAVA et al, 2002; STILWELL e GONÇALVES, 2002).

Os possíveis riscos à saúde humana decorrentes do emprego de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos podem estar associados aos resíduos dos mesmos em níveis acima dos limites máximos recomendados (LMR'S). Isto pode ocorrer quando o emprego do produto não observa as Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, em especial as especificações de uso. O conhecimento da

dimensão da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle visando à proteção do consumidor (ANVISA, 2003).

Os riscos à saúde impostos pela presença de antibióticos nos alimentos podem ser classificados em três categorias: farmacológicas e toxicológicas; microbiológicos (desenvolvimento de resistência de microrganismos patogênicos); e riscos imunopatológicos como alergias (HARDING, 1993). Além das razões no aspecto toxicológico e das possibilidades desses resíduos causarem reações alérgicas nos consumidores, atividades carcinogênicas ou mutagênicas podem eventualmente ocorrer (HEERSCHEN, 1993). Estima-se que aproximadamente 10% das pessoas são alérgicas às penicilinas e aos seus metabólitos (WEAVER, 1992). Os antibióticos do grupo beta lactâmicos (penicilinas) são os antibióticos mais administrados às vacas de leite. Considerando-se a alta porcentagem de pessoas alérgicas à penicilina e seu amplo uso nas propriedades leiteiras, os resíduos de penicilina constituem a maior preocupação, com relação aos riscos oferecidos aos humanos (LARANJA e MACHADO, 1994).

Em um programa básico de controle da mastite, recomenda-se que vacas que apresentem mastite clínica devem ser tratadas imediatamente, e que todas as vacas devem ser tratadas durante o período seco. Nesse caso, com o uso de antibiótico, o leite do animal tratado somente poderá ser destinado à alimentação humana após o prazo mínimo de carência estabelecido pelo fabricante na bula. Esse prazo depende do tipo de medicamento utilizado e regime de tratamento adotado (FONSECA e SANTOS, 2000).

Os limites máximos permitidos para resíduos de drogas para uso veterinário em alimentos são determinados pelo *Codex Alimentarius*, da FAO, e da Organização Mundial da Saúde (OMS) e são de importância fundamental por serem pontos de referência para o comércio internacional de alimentos (FONSECA e SANTOS, 2000).

3.3.2 Acidez titulável do leite

Microrganismos mesófilos predominam no leite em situações em que as condições básicas de higiene são inadequadas e inexistente refrigeração. Em tais circunstâncias,

bactérias como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas enterobactérias atuam intensamente na fermentação da lactose, produzindo ácido láctico e gerando, conseqüentemente, acidez do leite (GALTON *et al.*, 1986).

O teste de Dornic tem sido utilizado para a avaliação do leite, tendo por objetivo detectar aumentos na concentração de ácido láctico, uma vez que esse ácido é indicativo da fermentação da lactose por bactérias mesófilas e, conseqüentemente, pode indicar qualidade microbiológica inadequada da matéria-prima. No entanto, não é somente a presença de ácido láctico que determina a acidez, outros componentes do leite também interferem nesse parâmetro e, entre esses compostos, podemos destacar citratos, fosfatos e proteínas (FONSECA e SANTOS, 2000).

O teste de acidez é um dos mais comumente utilizados pela indústria leiteira e tem grande valor, uma vez que indica se o leite foi mantido em boas condições de controle do desenvolvimento dos microrganismos mesofílicos. A presença de acidez está correlacionada com o risco de ocorrência de coagulação do leite durante o processamento, já que o leite com maior acidez titulável possui menor estabilidade ao calor (FONSECA e SANTOS, 2000).

Os valores de pH e acidez do leite não são proporcionais, embora haja uma relação inversa; ou seja, à medida que a acidez se eleva, ocorre abaixamento do pH. A dificuldade na obtenção de uma boa correlação está ligada ao fato que na determinação da acidez são quantificados os prótons hidrogênio livres (íons) e acessíveis (ionizáveis/dissociáveis); por outro lado, apenas os prótons hidrogênio livres (íons) são quantificados na determinação do pH (SILVA e TORRES, 1995).

Parece existir certo consenso entre os pesquisadores de que o tipo de dieta a que os animais são submetidos não aumenta a acidez titulável do leite. A administração de dietas acidogênicas, produzidas seja através da alta suplementação de grãos, peletização ou moagem de todos os componentes (volumosos e concentrados) ou mesmo pela adição de ácido sulfúrico em baixas concentrações à dieta das vacas não foram capazes de alterar a acidez ou o pH do leite (AFONSO e VIANNI, 1995).

As diferentes raças leiteiras com suas diferentes composições de leite tem sido apontadas como um dos fatores que altera a acidez titulável, sendo que as vacas Jersey,

Pardo suíças ou vacas menos especializadas em produção leiteira, como as indianas e os produtos de suas cruzas, tem demonstrado maior acidez natural titulável, quando comparadas com vacas holandesas. A acidez titulável tem sido negativamente correlacionada com o teor de lactose no leite, mas positivamente correlacionada com o teor de gordura, sólidos totais e principalmente proteína (AFONSO e VIANNI, 1995).

3.3.3 Estabilidade térmica do leite através da graduação do álcool

A estabilidade do leite frente ao álcool é um teste rápido empregado nas plataformas de recepção da indústria leiteira como indicador de acidez e da estabilidade térmica do leite (COSTA *et al.*, 2004). Um aumento na acidez do leite, causada pelo crescimento de bactérias e produção de ácido láctico, produzirá um resultado positivo no teste como a coagulação do leite quando misturado com uma solução alcoólica, embora o pH preciso em que isto ocorre não seja o mesmo para todo tipo de leite (HORNE e PARKER, 1992).

O requisito da legislação brasileira é que o leite seja estável ao etanol a 72% (v/v) (BRASIL, 2002). Apesar da exigência legal, diversas indústrias utilizam soluções de teor alcoólico acima desta concentração, isto é, 78% ou mesmo 80%. Com a utilização de alto percentual alcoólico, tem aumentado a rejeição de leite pela indústria, com elevados prejuízos para os produtores. A rejeição se baseia na comprovação de que quando o leite coagula pelo etanol, está impróprio para o processamento devido à multiplicação bacteriana e desenvolvimento da acidez (COSTA *et al.*, 2004).

O emprego do teste do álcool iniciou-se na Europa central, no início do século XX, com citações oficiais a partir de 1915. O objetivo inicial era avaliação da qualidade do leite para venda ao varejo. Posteriormente, o teste foi aceito como indicador de acidez, mistura do leite com colostro ou leite proveniente de animais com mastite. A estabilidade ao etanol mostrou-se útil para seleção de leite a ser concentrado e, mais além para avaliação da estabilidade do leite ao aquecimento. Por volta de 1980, estudos apontaram o valor do teste pela similaridade observada entre a instabilidade induzida pelo etanol e a instabilidade induzida pelo processamento UHT (HORNE e PARKER, 1992).

Embora o uso desta prova tenha sido abolido nos EUA e outros países desenvolvidos, no Brasil ainda é de uso rotineiro na seleção de leite. Este teste permite a verificação da formação de coágulos pela ação do etanol, sendo resultado da caseína desnaturada associada com cálcio e fosfato de cálcio e outras proteínas (BROWNE, citado por HORNE e PARKER, 1992).

SILVA e ALMEIDA (1998) reforçam a importância desta prova no Brasil, afirmando que a estimativa da estabilidade térmica do leite por meio do teste do etanol ou do alizarol é um procedimento muito empregado para a verificação da estabilidade protéica do leite para tratamento térmico, pois, praticamente todos os fatores que afetam a estabilidade térmica afetam também a estabilidade frente aos diferentes álcoois.

É uma medida da qualidade da matéria-prima, ou seja, das suas condições de obtenção, conservação, estado sanitário do úbere dos animais, condições de transporte e tempo decorrido entre a ordenha e a sua recepção na indústria. A graduação alcoólica empregada é proporcional ao rigor requerido no teste. A ocorrência de coagulação ocorre por efeito da elevada acidez ou de desequilíbrio salino, quando se promove desestabilização das micelas pelo álcool. Altas contaminações microbianas tornam o leite mais ácido do que o normal (GUIMARÃES, 1998).

Segundo SILVA *et al.* (2004) outros fatores que também alteram a estabilidade térmica do leite negativamente são: a alta atividade do cálcio, baixa atividade de fosfatos e citratos e sucessivos tratamentos térmicos. A ocorrência de testes positivos frente ao álcool ou do alizarol mesmo sem a acidez no leite pode ser resultado de desequilíbrio salino. A quantidade de cálcio, fosfatos e citratos encontrados no leite está diretamente relacionado a alimentação que é fornecida aos animais que são ordenhados, e estações chuvosas e secas influem na pastagem fornecida podendo alterar a estabilidade do leite frente ao álcool dependendo da estação.

HARWALKAR (1997) ao discutir as alterações durante a estocagem de leite UHT e autoclavado, afirmou que o complexo coloidal entre cálcio, fosfato e caseinato tem a sua estabilidade afetada e que há uma perda gradual da estabilidade do leite ao etanol. E resultados do trabalho de SAMUEL (1971), citados por HARWALKAR (1997), contribuíram para evidenciar a redução da estabilidade do leite UHT ao etanol durante

sua vida de prateleira, o trabalho demonstrou que com nove meses de estocagem o valor do teste do álcool caiu de 96°GL para 62°GL.

3.3.4 Crioscopia do leite

Julius Hortvet, durante a década de 20, foi o pioneiro na utilização da avaliação da temperatura de congelamento do leite para detectar fraudes por adição de água. Durante a década de 60, um grande estudo americano serviu de base para fixar os padrões de referência para esta característica. Para tal, utilizou-se a escala HORTVET (°H), isto gerou grande confusão, ao se pensar que a escala HORTVET era semelhante a escala CELSIUS. Entretanto, hoje se sabe que amostras de leite avaliadas pela escala HORTVET geram resultados 3,7% maiores que aqueles avaliados pela escala CELSIUS (°C) (FONSECA e SANTOS, 2000).

A crioscopia do leite corresponde à medição do ponto de congelamento ou da depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água. A composição normal do leite gera um valor aproximado de -0,531°C (-0,550°H) para o ponto crioscópico. Este valor depende de uma série de fatores relacionados ao animal, ao leite, ao ambiente, ao processamento e às técnicas crioscópicas, ocasionando dificuldades para o estabelecimento de padrões crioscópicos (PEREIRA *et al.*, 2000).

A adição de água ao leite é fraude reconhecida mundialmente e altera a qualidade e aceitação do leite e derivados pelo consumidor. Esta prática existe em proporções variáveis, de acordo com a região, ou mesmo com o grau de conscientização do produtor rural (SÁ, 2004).

Pequenas quantidades de água adicionadas, fazem o ponto de congelamento elevar-se, ou seja, aproximar-se do ponto de congelamento da água, que é igual a zero °H. Ponto de congelamento acima de -0,530°H sugere alguma adição de água, enquanto que leite com ponto de congelamento acima de -0,525°H é considerado adulterado. Já a diminuição do ponto de congelamento abaixo de -0,550°H indica adulteração pela adição

de sacarose, soro de queijo, urina, conservantes ou outros solutos (FONSECA e SANTOS, 2000).

A venda de produtos fraudados com água ou qualquer outro composto está sujeita as sanções penais. Infelizmente, porém, as infrações são muito mais freqüentes do que se imagina, de forma que essas fraudes comprometem características sensoriais e, às vezes, o valor nutritivo dos alimentos. Práticas sempre prejudiciais aos consumidores e à indústria, já que não se podem fabricar derivados com leite fraudados (SÁ, 2004).

Embora possa indicar adulteração do leite, alguns pesquisadores não consideram o ponto de congelamento como uma medida totalmente precisa para indicar adição fraudulenta de água no leite, sendo esta característica influenciada pela fase de lactação, estação do ano, clima, latitude, alimentação e raça. Uma causa de adição accidental de água no leite pode ser devido a erros na operação e limpeza do equipamento de ordenha ou refrigeração. Na maioria das vezes, o nível de água accidentalmente adicionada ao leite pode diminuir com a solução desses problemas, exceto se a causa for erro de projeto da ordenhadeira (PEREIRA *et al.*, 2000).

3.3.5 Redutase do leite

A prova de redutase é uma forma indireta de medir a contagem de microrganismos mesófilos. De acordo com a legislação brasileira o tempo de redutase mínimo para recebimento do leite cru é de 90 minutos (FONSECA e SANTOS, 2000; BRASIL, 2002).

Falhas ocorridas durante a obtenção do leite, como a falta de higiene na ordenha e de limpeza e desinfecção correta de ordenhadeiras e tanques, assim como a qualidade da água utilizada, podem afetar significativamente a sua carga microbiana, fazendo com que o leite entre no tanque de resfriamento com altas contagens iniciais de microrganismos mesófilos (PICININ, 2003). MONSALILIER (1994), citado por PICININ (2003), constatou que além das ordenhadeiras e dos tanques, o teto e o úbere seriam as principais fontes de contaminação do leite cru nas fazendas leiteiras.

Há grande similaridade entre as populações bacterianas encontradas no leite fresco com aquelas encontradas nas superfícies internas da ordenhadeira. Entretanto, é difícil avaliar a contribuição do equipamento de ordenha sobre a carga microbiana total do leite. Em condições experimentais, utilizando-se água esterilizada para lavar o equipamento de ordenha, constatou-se que a ordenhadeira poderia contribuir com até 10% da carga bacteriana total do leite. Esses valores sofreriam aumento considerável quando não há limpeza eficiente no sistema (FONSECA e SANTOS, 2000).

PRZYSYCHA e SLOSARZ (2000) trabalhou com ordenhadeiras mecânicas em más condições higiênico-sanitárias e, posteriormente, comparou a qualidade do leite obtido mecanicamente com o obtido manualmente. O método de ordenha teve influência significativa nos testes de redutase.

A quantidade inicial de microrganismos está relacionada com a limpeza dos utensílios utilizados para retirada e transporte do leite. Logo, a higienização do sistema de ordenha, baldes e latões seriam os principais fatores responsáveis pela produção de leite de alta qualidade. Para manter um bom padrão microbiológico, deve-se atentar à ordenha e ao armazenamento do leite. Em 95% dos problemas de alta contagem bacteriana total a origem deste problema está na deficiência de limpeza e sanitização de utensílios e do sistema de ordenha e deficiência na higiene da ordenha (FONSECA e SANTOS, 2000)

3.3.6 Temperatura de transporte e granelização do leite

A qualidade do leite no Brasil tem melhorado substancialmente a partir de 2001. As condições favoráveis relacionadas as oportunidades de exportação, permitiram a implementação do Programa de Melhoria da Qualidade do Leite (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002). Esta Instrução estabelece critérios para a produção, identidade e qualidade do leite, o que produziu a implementação de melhorias como a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (MARTINS, 2004).

Essas duas medidas de impacto direto sobre a estrutura de produção leiteira (resfriamento do leite na fazenda e a sua coleta a granel), alteraram a paisagem do campo na grande maioria das regiões, resultando no desaparecimento da coleta em latão e do recebimento de leite quente. Não há dúvida de que esta foi a medida que, isoladamente, trouxe maior e mais rápido impacto sobre a melhoria da qualidade do leite (SANTOS e FONSECA, 2003).

A racionalização da coleta e do transporte do leite até a indústria é uma tendência mundial, beneficiando toda a cadeia do leite. A refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas que causam a acidificação. Entretanto, isso levou ao favorecimento da multiplicação da microbiota psicotrófica presente na matéria-prima. Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C, condição esta que favorece a proliferação de microrganismo psicrotróficos (FAGUNDES *et al.*, 2004). Cerca de 80% dos 5,25 bilhões de litros de leite que passam pelas cooperativas são resfriados na fazenda e coletados a granel (ALVARES *et al.*, 2003).

Na maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5 a 10°C, o que configura, um “resfriamento marginal do leite”, contribuindo para multiplicação de microrganismos psicrotróficos (FONSECA e SANTOS, 2000).

Dependendo do produto a que se destina, o leite cru é submetido a vários tipos de tratamentos e processos tecnológicos que promovem uma alteração qualitativa e quantitativa em sua microbiota inicial. A predominância de determinadas espécies dependerá das modificações físicas e químicas empregadas, tais como temperatura, atividade de água, potencial redox e pH (MORENO *et al.*, 2002).

Geralmente, o resultado dessas modificações é uma diminuição da microbiota total e uma seleção de microrganismos específicos, como por exemplo, os psicrotróficos em produtos refrigerados e os esporulados em produtos tratados termicamente (MORENO *et al.*, 2002).

Apesar dos enormes e inegáveis benefícios oriundos do resfriamento do leite na fazenda e granelização do transporte, uma série de fatores limitantes merecem ser

mencionados e ponderados. Dentre os fatores limitantes, podemos apontar: eletrificação rural, estrutura viária, custo do resfriador, treinamento dos produtores e potencial de marginalização/exclusão de pequenos produtores (SANTOS e FONSECA, 2003).

3.3.7 Contagem de células somáticas no leite

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária que em sua grande maioria tem origem bacteriana. Essa resposta inflamatória da glândula mamária apresenta como consequência direta o aumento no número de leucócitos de origem sangüínea que são transportados para dentro do lúmen alveolar. Dessa forma, o termo “células somáticas no leite” é utilizado para designar todas as células presentes no leite, que incluem as células de origem do sangue (leucócitos) e células de descamação do epitélio glandular secretor (NATZKE, 1981).

Em animais sadios, 65% a 70% do total de células somáticas são células de origem epitelial, enquanto esse número cai para 50% em animais com mastite crônica, e alcança valores ainda mais baixos (10% a 45%) nos casos mais severos do processo inflamatório. O aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite nos casos de mastite se dá pela maior passagem de leucócitos do sangue para a glândula mamária, aliada a maior descamação do epitélio lesado (FONSECA e SANTOS, 2000).

A elevação da CCS no leite em um quarto afetado por mastite está geralmente associada à diminuição da produção de leite naquele quarto. Essa redução na produção de leite ocorre devido ao dano físico nas células epiteliais secretoras da glândula mamária, assim como a alterações na permeabilidade vascular no alvéolo secretor (KITCHEN, 1991).

Em leites provenientes de animais com mastite, ocorre aumento da rota paracelular de secreção de constituintes do sangue no leite. Como consequência, tem-se aumento de frações de soro do sangue e desequilíbrio salino. Ocorre elevação no pH e diminuição da estabilidade das proteínas nativas do leite. Tais fatores contribuem para a redução da estabilidade térmica do leite (WALSTRA e JENNESS, 1984).

Os prejuízos econômicos tanto para o produtor quanto para a indústria de laticínios decorrente da presença da mastite, representada pela elevada CCS, são significativos. Em relação ao produtor, os custos econômicos estão relacionadas à queda na produção por parte dos animais infectados, custos adicionais associados a descarte de animais e despesas com veterinários. As perdas econômicas causadas pela doença se apresentam na seguinte ordem: valor da produção de leite perdida (70% do total); descarte prematuro de animais (14%); valor do leite descartado (7%) e despesas com veterinário e tratamentos (8%) (BLOSSER, 1979).

A presença de altas CCS afeta a composição do leite e o tempo de vida de prateleira dos derivados, causando enormes prejuízos para a indústria de laticínios. A ocorrência de mastite subclínica, e conseqüentemente de altas CCS, causa diminuição da síntese de caseína que é importante para a fabricação de queijo e aumenta a síntese das proteínas do soro, que são indesejáveis. Leite com altas CCS causa redução na produção e rendimento industrial de queijos, aumento do conteúdo de água, aumento do tempo de coagulação, aumento do conteúdo de sólidos no soro e, como resultado, o produto final apresenta sabor inferior (NATZKE, 1981).

Para manteiga, leite em pó e outros derivados, a alta CCS causa principalmente a diminuição da vida de prateleira desses produtos, pois as células somáticas contêm enzimas proteolíticas e lipolíticas que são resistentes à pasteurização e que causam a deterioração da gordura, produzindo o sabor rançoso e alterando a característica da proteína do leite e derivados. O leite com alta CCS apresenta ainda redução do nível de lactose e cálcio, que são constituintes nobres do leite, enquanto há aumento da concentração de sódio e cloro, o que causa o sabor salgado do leite com mastite (FONSECA e SANTOS, 2000).

3.3.8 Gordura do leite

A gordura do leite é composta em sua quase totalidade por triglicerídeos (98% da gordura total). Esses triglicérides presentes no leite são sintetizados nas células epiteliais

da glândula mamária, sendo que os ácidos graxos que compõem esses triacilglicerídeos podem vir de duas fontes: a partir de lipídeos presentes no sangue e pela síntese nas células epiteliais (FONSECA e SANTOS, 2000).

Ocorre uma grande remoção de triglicerídeos da corrente sanguínea pela glândula mamária, os quais são utilizados para a síntese da gordura que será secretada no leite. Os ácidos graxos de cadeia longa podem ser transferidos diretamente do sangue para a glândula mamária, mas a maioria dos ácidos graxos encontrados no leite é de cadeia curta (menos de 16 carbonos), os quais são sintetizados pelas células da glândula mamária (FONSECA e SANTOS, 2000).

Devido à síntese de gordura do leite ser um processo dinâmico, mudanças na dieta podem alterar a proporção de diferentes ácidos graxos na síntese do leite. Como exemplo, quando são utilizadas grandes quantidades de alimentos concentrados na dieta de vacas leiteiras, ocorre uma diminuição da proporção de síntese de ácido acético em relação ao ácido propiônico, o que leva a uma diminuição da síntese total de gordura pela glândula mamária (RIBAS, 1998).

SUTTON (1989) demonstrou que à medida que o consumo de matéria seca se eleva, tende a haver redução na produção de gordura no leite, embora as magnitudes desta redução sejam variáveis. BACHMAN (1992) sugere que a ingestão maior de uma dieta corretamente balanceada tende a elevar a produção de leite sem alterar a composição da gordura. Talvez o problema esteja justamente em se atingir esta dieta corretamente balanceada na prática. Com o aumento do consumo, haverá provavelmente elevação na produção de leite. Para que a proporção de componentes seja mantida, é necessário que todos os precursores de gordura e proteína estejam em proporções otimizadas.

A gordura presente no leite pode sofrer alterações durante a vida de prateleira do produto e causar sabores indesejáveis nos produtos finais devido a ação de lipases produzidas por microrganismos psicrótróficos. Os lipídios presentes no leite encontram-se na forma globular envoltos por uma camada composta por proteínas, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e glicerídios. Desta forma, para que as enzimas lipolíticas tenham acesso aos lipídios no interior do glóbulo de gordura do leite é necessário que haja o

rompimento dessa membrana, o que pode ocorrer por ação mecânica ou enzimática de fosfolipases e glicosidases (COUSIN, 1982).

As fosfolipases de origem microbiana podem, assim, hidrolisar os fosfolipídios da membrana do glóbulo de gordura e, conseqüentemente, aumentar a capacidade lipolítica das lipases sobre os triglicerídeos. O resultado da ação das lipases é a formação de ácidos graxos livres, mono, e diglicerídios, resultando em altos níveis de ácido butírico e capróico. A presença de ácidos graxos livres e a sua posterior degradação como resultado da ação de lipases resulta no aparecimento de sabor rançoso no leite e seus derivados, em especial quando esses ácidos são de cadeia curta, menos de 12 carbonos (ANDERSON, 1983).

3.4 MICRORGANISMOS NO LEITE

Em 1837, Pasteur foi o primeiro cientista a compreender o papel dos microrganismos nos alimentos, demonstrando que o azedamento do leite era provocado pelos mesmos. E, em 1860, empregou o calor para destruir microrganismos indesejáveis em alimentos. Este processo denomina-se pasteurização (HOFFMANN *et al.*, 1999). Em 1933, Charles Porcher definiu exatamente o objetivo da pasteurização, que é destruir sua microbiota banal e patogêna, por emprego apropriado de calor, procurando alterar o menos possível a estrutura física, seu equilíbrio químico e suas vitaminas (ROQUE *et al.*, 2003). GOUNOT (1986) e SILVA (1991) observaram que os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura, podendo ser divididos em psicrótrófos, mesófilos, termófilos.

Os psicrófilos constituem o grupo de bactérias que encontram em temperaturas que podem variar de 0° a 20°C sua temperatura ótima de crescimento. Na área de microbiologia de alimentos, os organismos capazes de se desenvolver na faixa de temperatura considerada adequada para os psicrófilos, mesmo que essa temperatura não seja ótima para o seu crescimento, são denominados psicrótrófos e são assim denominados por crescerem entre temperaturas de 0 a 40°C (COLLINS, 1981;

SANTANA, 2001). Os mesófilos constituem o grupo que inclui a maioria dos microrganismos acidificantes no leite, e podem ser caracterizados por se desenvolverem entre temperaturas de 20 a 45°C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30 e 40°C (JAY, 1996). As bactérias termófilas são definidas como aquelas cuja temperatura ótima de crescimento situa-se entre 45 a 65°C, e para algumas espécies consideradas como termófilos extremos as temperaturas de crescimento podem atingir 90°C e o mínimo em torno de 35°C (ICMSF, 1994). O leite cru normalmente contém poucas bactérias termófilas, embora elas possam estar presentes em número suficiente para se desenvolverem no leite mantido a temperaturas elevadas, acarretando grande número desses microrganismos no produto. Essas bactérias constituem problema no leite pasteurizado quando algumas porções são mantidas, por algum tempo, entre 50°C a 70°C (ICMSF, 1994).

Tem-se observado que um grande número de espécies consideradas estritamente mesófilas, já estão sendo incluídas também entre os psicrotróficos (SILVEIRA *et al.*, 1998). ANTUNES *et al.* (2002) relataram a presença de microrganismos psicrotróficos representando 23% da microbiota do leite *in natura* os quais em condições de refrigeração multiplicam-se mais rapidamente do que a microbiota mesofílica, tornando-se predominante. SANTANA (2001) citou que temperaturas em torno de 4°C controlam o crescimento de microrganismos mesófilos, que em geral provocam acidificação e causam perdas econômicas para produtores e indústrias.

O termo psicrotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo do século. Outros termos sinônimos são usados, tais como: psicrófilos facultativos, tolerantes ao frio ou psicrotolerantes (GOUNOT, 1986). Segundo COLLINS (1981), de acordo com as normas da Internacional Dairy Federation, os psicrotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem desenvolver-se a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento. Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos relativamente longos (1 a 4 semanas). O problema torna-se ainda mais sério quando se considera que o uso intensivo da refrigeração, desde a fazenda até a residência do consumidor, pode provocar uma gradativa seleção para esse grupo (SILVEIRA *et al.*, 1998). Quanto maior o tempo de armazenamento do leite

resfriado, maiores as chances de multiplicação microbiana, em especial dos microrganismos psicotróficos. Geralmente, esta microbiota se torna predominante no leite resfriado após 2 a 3 dias. Uma importante característica dos psicotróficos comumente encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite, a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas produzidas por estes microrganismos, sendo consideradas enzimas termorresistentes (MUIR, 1996; CUNHA e BRANDÃO, 2000; SANTOS e FONSECA, 2003).

3.4.1 Microrganismos psicotróficos no leite

Os psicotróficos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos, apresentando aproximadamente 15 gêneros diferentes que foram isolados do leite e produtos derivados (SUHREN, 1989). Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos; assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios. Fazem parte deste grupo tanto bactérias Gram-negativas – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp - como bactérias Gram-positivas – *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Alguns gêneros de bolores e leveduras também apresentam características do grupo dos psicotróficos e podem causar problemas de qualidade do leite (SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

Uma importante característica dos psicotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes microrganismos (MUIR, 1996; CUNHA e BRANDÃO, 2000; SANTOS e FONSECA, 2003). Referindo-se a capacidade de produção de enzimas, SILVA (2004) reporta a existência

de vários tipos de proteases presentes no leite bovino, algumas originadas do desenvolvimento de microrganismos e outras derivadas do sangue do animal, sendo que, a concentração destas enzimas depende da raça do animal, da alimentação, do estágio da lactação e de doenças como a mastite. As principais proteases são plasmina, plasminogênio, ativadores de plasminogênio, trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite, aminopeptidases e proteases derivadas de leucócitos (células somáticas). De acordo com SORHAUG e STEPANIAK (1997), um dos principais fatores que influenciam a qualidade dos produtos lácteos fabricados com matéria-prima mantida a 7°C ou menos por períodos prolongados, é a multiplicação da microbiota psicotrófica contaminante produtora de proteases termoestáveis. A inativação completa destas enzimas pelos tratamentos térmicos adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando a sua elevada termorresistência (ZALL e CHAN, 1981). ADAMS *et al.* (1975) estudaram a resistência térmica de proteases extracelulares produzidas por *Pseudomonas*. A destruição de 90% das proteases pôde ser atingida a 72°C por 4 a 5 horas, tratamento este considerado altamente prejudicial ao leite. GRIFFITHS *et al.* (1981) isolando bactérias psicotróficas de produtos de laticínios, observaram a resistência térmica de suas proteases e lipases ao tratamento de 77°C por 17 segundos e 140°C por 5 segundos.

Uma ampla gama de problemas de qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana como: alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e geleificação do leite longa vida (COUSIN, 1982; KOHLMANN *et al.*, 1991; MUIR, 1996). DATTA e DEETH (2001) também citam geleificação do leite UHT durante o período de estocagem como um grande problema causado por enzimas de psicotróficos. Essas enzimas estão relacionadas também com defeitos sensoriais (CELESTINO *et al.*, 1996; WIKING *et al.*, 2002), instabilidade térmica do leite (ADAMS *et al.*, 1976), e redução no rendimento na produção de queijos (RICHTER, 1979; STOFER e HICKS, 1983). CUNHA e BRANDÃO (2000) citam que as enzimas termorresistentes originadas de psicotróficos são responsáveis pelo desenvolvimento de sabor residual no leite pasteurizado, e pela deficiência de determinados processos na produção de queijos, como a perda de rendimento e aparecimento de defeitos. Dessa forma, causando grandes perdas

econômicas para as indústrias de laticínios. Estas enzimas de origem microbiana podem estar localizadas dentro das bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou serem excretadas para o meio (extracelulares) (SANTOS e FONSECA, 2003). As enzimas intracelulares e aquelas associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite quando ocorre a lise celular das bactérias, após o tratamento térmico e, desta forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite (KOHLMANN *et al.*, 1991).

A lipólise resulta da ação de lipases (naturais e/ou microbianas), enzimas que tem a propriedade de hidrolisar os triglicerídeos da gordura, liberando os ácidos graxos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico e cáprico), que são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. A lipase natural presente no leite é uma enzima termosensível, facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos aos lipídeos de um leite manuseado e processado adequadamente. Entretanto, as lipases microbianas podem causar alterações na gordura do leite após o processamento térmico, uma vez que são resistentes a temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas (GOMES, 1988). TERNSTRON *et al.* (1993) citam que a atividade lipolítica dos microrganismos psicotróficos é de grande importância em laticínios. *Pseudomonas fragi* é evidenciada como lipolítica, quando cresce em baixas temperaturas. Os autores destacam ainda as diferentes temperaturas e pH, onde a ação da lipase é considerada ótima e a especificidade pelos triglicerídeos também difere entre as lipases produzidas pelos psicotróficos. As lipases produzidas por bactérias psicotróficas são resistentes à temperatura empregada na pasteurização (72-76°C por 15-20 segundos) e no tratamento com temperatura ultra-alta (142-145°C por 4-6 segundos). Portanto, essas enzimas apresentam grande importância na qualidade e na vida de prateleira de produtos lácteos como queijos, leite longa vida e creme de leite (SWAISGOOD e BOSOGU, 1984).

Já as proteases produzidas por bactérias psicotróficas agem sobre a caseína de forma semelhante à quimosina, liberando o caseinomacropeptídeo – CMP, porém apresentam menor especificidade (DATTA e DEETH, 2001). Na indústria de queijos, os produtores têm sérios problemas com relação ao rendimento dos mesmos, devido à atuação de bactérias, principalmente psicotróficas, sobre a proteína do leite. Também os

microrganismos utilizam em seu metabolismo outros componentes do leite, podendo produzir produtos metabólicos de sabores e odores estranhos, assim como enzimas termoestáveis que vão trazer ao alimento alterações indesejáveis. RANIS e LEWIS (1995) afirmam que mesmo em produtos finais que tenham uma contagem bacteriana dentro dos padrões legais, este tipo de transformação pode ocorrer. SORHAUG e STEPANIAK (1997) também reportaram que a estocagem do leite a frio suprime o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido, mas selecionam microrganismos psicotróficos produtores de proteases. Estas afetam, predominantemente, a κ -caseína, enquanto a β -caseína e a α -s-caseína são menos susceptíveis. A pasteurização e outros tratamentos subsequentes destroem ou removem estes microrganismos, mas proteinases e lipases exocelulares termorresistentes produzidas por eles representam um importante fator de deterioração do leite durante a estocagem.

Segundo DESAMASURES e GUEGUEN (1997), em extenso trabalho relatando os resultados do monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado, apontaram o microrganismo psicotrófico do gênero *Pseudomonas* como o mais importante em termos de contaminação microbiológica. Outros microrganismos isolados neste estudo foram lactococos, lactobacilos e leveduras. WIEDMANN *et al.* (2000) e PINTO *et al.* (2004) também relatam que o principal gênero da microbiota psicotrófica envolvida na produção de enzimas no leite cru é o gênero *Pseudomonas*. Esse gênero inclui espécies que se caracterizam por apresentar alta diversidade genética (MARTINS *et al.*, 2003) e mecanismos fisiológicos de adaptação e crescimento a baixas temperaturas (JAY, 1996). O gênero *Pseudomonas*, considerado o mais importante dentre os psicotróficos, pode ser encontrado em aproximadamente 10% da microbiota do leite recém-ordenhado (MUIR, 1996), sendo que sob condições de refrigeração este gênero rapidamente predomina na microbiota tanto do leite cru como do leite pasteurizado (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Este gênero é representado por espécies que apresentam os menores tempos de multiplicação em temperaturas entre 0 e 7°C (4-12 horas) e podem crescer em temperaturas tão baixas quanto 10°C (MUIR, 1996).

No leite tratado pelo sistema UHT, o problema com enzimas torna-se mais comum. O leite apenas pasteurizado parece ser mais resistente à proteólise do que o leite UHT. O uso de altas temperaturas durante o processamento pode expor novos sítios moleculares

das proteínas à ação das proteases (McKELLAR, 1981). Segundo ARAÚJO (1995), a desnaturação das proteínas causada pela temperatura elevada utilizada durante o processo UHT, altera várias propriedades importantes das proteínas, do ponto de vista da tecnologia de alimentos. A proteína desnaturada é, geralmente, menos solúvel ou até mesmo insolúvel, promovendo aumento na viscosidade do alimento e tem a reatividade de seus grupos laterais intensificada. ARAÚJO (1995) cita ainda que a proteína desnaturada é mais sensível à hidrólise por enzimas proteolíticas produzidas por psicotróficos. GILLIS *et al.* (1985) investigaram a presença de enzimas termorresistentes e microrganismos no leite UHT e a sua influência nas mudanças sensoriais durante a estocagem com redução da qualidade e por consequência, diminuição da vida útil. A pasteurização do leite cru causa um aumento na atividade proteolítica e uma queda na atividade lipolítica. COUSIN (1982) citou a existência de uma fosfolipase, produzida por psicotróficos, que pode assumir papel importante na deterioração do leite. Seu mecanismo de ação seria sobre a membrana do glóbulo de gordura. Após a degradação dessa membrana, os lipídeos ficariam susceptíveis à ação das lipases.

A qualidade de um produto está diretamente relacionada com a qualidade da matéria-prima empregada na sua elaboração. A microflora inicial influencia grandemente nessa qualidade do leite cru e consequentemente dos produtos com ele fabricados. As técnicas usuais de manuseio de leite cru freqüentemente resultam em altas contagens de psicotróficos antes da fabricação de produtos lácteos, que através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas produzem substâncias indesejáveis aos produtos (FONSECA e SANTOS, 2000). Apesar da importância dos psicotróficos, o Ministério da Agricultura não estipula um padrão de qualidade e identidade do leite, baseado na contagem de unidades formadoras de colônia destes microrganismos. No Brasil não existe uma regulamentação sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura* destinado à fabricação de produtos lácteos específicos. Apesar disso, com base nos dados da literatura é imprudente a fabricação de produtos a partir do leite em que a contagem de psicotróficos tenha excedido a 10^6 UFC/mL, pois neste caso é grande a possibilidade da presença de enzimas degradativas extracelulares. Mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação brasileira para a conservação do leite na fonte de produção e no

estabelecimento industrial pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado (MARTINS *et al.*, 2004).

Na atual conjuntura de desenvolvimento da cadeia agroindustrial do leite, é pertinente que se faça uma análise dos pontos críticos que podem levar a um alto risco de contaminação do leite com microrganismos psicrotróficos (SANTOS e FONSECA, 2003). Há uma grande necessidade de associar-se à refrigeração as boas práticas de produção e fabricação para que se evite ou controle a contaminação do leite por microrganismo psicrotróficos (FONSECA e SANTOS, 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Adotou-se como objeto de estudo o leite cru (matéria-prima) de uma indústria de laticínios situada na região metropolitana de Curitiba.

As amostras foram coletadas em caminhões isotérmicos que transportam o leite até o laticínio. Foram especificadas duas regiões: Curitiba e região metropolitana (Região 1) e região do Alto Vale de Santa Catarina (Região 2). Essa forma de divisão em duas regiões deve-se a procedência do leite que chega diariamente até a indústria. Desta forma será possível identificar qual é a região que necessita de maior ação por parte do suporte técnico de campo do laticínio. Na Região 1, o leite é coletado de produtores que possuem suas granjas leiteiras em Curitiba, Piraquara, Campo Largo, Colombo, Lapa, São José dos Pinhais, Pinhais e Palmeira. Este leite chega até o laticínio em caminhões isotérmicos com um tempo médio de pós-ordenha de 24/48 horas. A capacidade de transporte desses caminhões é de 12 a 16 mil litros de leite para cada um deles. Na Região 2, o leite coletado passa por um entreposto de resfriamento do laticínio antes de chegar até a indústria, com o tempo médio de pós-ordenha do leite até o recebimento no laticínio de 72 horas ou mais. O entreposto está situado na cidade de Aurora no Estado de Santa Catarina. O leite procedente das granjas leiteiras é resfriado e depois transportado para Curitiba em carretas com capacidade de 26 e 30 mil litros de leite.

As análises físico-químicas realizadas foram: pesquisa de antibiótico no leite, determinação da acidez, estabilidade térmica através da graduação do álcool, determinação do ponto crioscópico do leite, determinação da redutase, contagem de células somáticas, porcentagem de gordura e a análise microbiológica, nesta última foi realizada a contagem de microrganismos psicotróficos do leite dos caminhões de ambas as regiões, antes que fosse efetuado o descarregamento dos mesmos nos silos de leite cru. As amostras, em um total de 60 para cada região, foram coletadas nos meses de janeiro, fevereiro e março de 2005. Esse período de coleta das amostras corresponde ao período de seca para ambas regiões.

Em uma segunda fase do experimento, o leite proveniente das duas regiões foi submetido às seguintes condições de estocagem: tempo de 4, 20 e 36 horas e temperaturas de 1, 3 e 6°C. Os tempos e temperaturas de estocagem escolhidos para realizar os ensaios neste trabalho correspondem a situações reais que podem ser encontradas no laticínio localizado na região metropolitana de Curitiba e que foi o local de estudo neste trabalho.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pesquisa de antibiótico no leite

Utilizou-se para esta análise o Kit Snap[®] da IDEXX para beta lactâmicos e o Kit Snap[®] da IDEXX para tetraciclina conforme AUP/CGI/DIPOA N.º2699/2005.

4.2.2 Determinação da acidez titulável do leite

Análise realizada utilizando titulação com solução de Dornic, conforme LANARA (1981).

A determinação da acidez titulável consiste na titulação de determinado volume de leite por uma solução alcalina de concentração conhecida (hidróxido de sódio 0,111 ou 0,1 mol/L, dependendo do método empregado), utilizado como indicador a fenolftaleína (SILVA *et al.*, 1997). O resultado pode ser expresso em °D ou porcentagem de compostos com caráter ácido expressa como ácido láctico.

4.2.3 Método de análise para determinar a estabilidade térmica do leite através da graduação do álcool

Para esta análise utilizou-se a técnica descrita em LANARA (1981).

Essa análise objetiva estimar a estabilidade térmica do leite por meio da reação com uma solução alcoólica (SILVA *et al.*, 1997).

4.2.4 Determinação do ponto crioscópico do leite

A determinação do ponto crioscópico do leite foi realizada através da utilização de crioscópios da marca Laktron e ITR, conforme consta em LANARA (1981).

4.2.5 Determinar a redutase do leite cru

A prova da redutase foi realizada utilizando-se solução de azul de metileno, conforme LANARA (1981).

Nas análises de prova de redução do azul de metileno, também conhecida apenas por redutase, quando a mistura 10 mL de leite e 1 mL de azul de metileno perder a coloração azul, ou seja, ficar 4/5 do tubo branco novamente, marcar o horário. O resultado corresponde ao número de horas que a amostra levou para perder a coloração.

4.2.6 Medição da temperatura

A análise de medição da temperatura foi realizada por termômetro digital por medição direta. Durante o experimento foram medidas as temperaturas de chegada do leite no momento da recepção.

4.2.7 Determinação da contagem de células somáticas (CCS)

A contagem de células somáticas foi realizada através da utilização de um Contador de Células do Leite Somacount 500.

O Somacount 500 é um instrumento seguro e preciso da linha de analisador de leite da Bentley Instruments.

As análises de contagem CCS foram realizadas no laboratório da Associação Paranaense de Criadores Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), que é um dos laboratórios oficiais credenciados pelo Ministério da Agricultura no Paraná.

4.2.8 Determinação da gordura do leite

Nesta prova utilizou-se a metodologia utilizando butirômetro de Gerber para leite, conforme LANARA (1981).

A análise de gordura em leite baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool amílico. O ácido digere as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e liquefaz a gordura, devido à liberação de calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool amílico) (SILVA *et al.*, 1997). A leitura é feita na escala graduada do butirômetro, após centrifugação.

4.2.9 Determinação da contagem de microrganismos psicrotróficos em petrifilm

Utilizou-se a contagem de microrganismos psicrotróficos modificada por OLIVEIRA e PARMELEE (1976) realizando a semeadura em petrifilm AC da marca 3M®.

O binômio tempo/temperatura (10 dias/7°C) utilizado na incubação das placas neste método permite que apenas psicrotróficos se multipliquem facilitando a sua enumeração (PEREIRA Jr. *et al.*, 2002). OLIVEIRA e PARMELEE (1976) desenvolveram uma contagem de psicrotróficos modificada que possibilita a enumeração dos microrganismos em menor tempo. A modificação realizada foi simplesmente mudar o binômio tempo/temperatura de incubação das placas para 25 horas/21°C.

A “International Dairy Federation” (IDF) desde 1991 passou a considerar o método de contagem de psicotróficos modificada como técnica de referência (PEREIRA Jr. *et al.*, 2002).

4.2.10 Temperatura x tempo de estocagem

As amostras de leite cru das regiões foram armazenados em frascos esterilizados de 500 mL de capacidade no momento em que chegavam até o laticínio. O leite posteriormente foi estocado em câmara incubadora B.O.D. 347 da marca Fanem® na temperatura determinada previamente (1, 3 ou 6°C) simulando as temperaturas encontradas no silo de leite cru do laticínio. Realizou-se análise inicial de contagem de microrganismos psicotróficos que correspondeu ao tempo zero e após isto o leite foi armazenado, realizando-se análises posteriores às 4, 20 e 36 horas de incubação. Após cada análise, o frasco contendo a amostra de leite retornava imediatamente a incubadora, após a última análise, o restante do leite foi descartado. Foram realizadas 3 análises para cada região nas 3 temperaturas estudadas. Essas análises foram feitas em triplicata conforme técnica de contagem de microrganismos psicotróficos modificada por OLIVEIRA e PARMELEE (1976) já descrita no ponto 4.2.9.

4.3 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Na primeira parte do experimento, os dados obtidos nas Regiões 1 e 2 foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com 60 repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade. Para a obtenção das análises estatísticas foi utilizado o programa MSTAT, versão 2.11. As variáveis analisadas fazem parte de algumas das exigências feitas pela IN 51 do MAPA para a recepção da matéria prima em um laticínio. As variáveis analisadas foram acidez titulável, estabilidade ao álcool (ÁLCOOL), crioscopia (CRIOSC.), redutase (TRAM), temperatura

(TEMP.), contagem de células somáticas (CCS), porcentagem de gordura no leite (GORD.) e contagem de microrganismos psicotróficos (PSIC.).

Na segunda fase do experimento os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com 24 tratamentos e 3 repetições cada. Os tratamentos representam o arranjo dos fatores região (2), temperatura (3) e tempo de estocagem (4). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade e utilizou-se o programa MSTAT, versão 2.11.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS REGIÕES 1 E 2

Os resultados da análise de variância para a comparação das duas regiões avaliadas são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ACIDEZ, ÁLCOOL, CRIOSCOPIA, REDUTASE, TEMPERATURA, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, PORCENTAGEM DE GORDURA E PSICOTRÓFICOS ENTRE AS DUAS REGIÕES ESTUDADAS

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS							
		ACIDEZ	ÁLCOOL	CRIOSC.	REDUT.	TEMP.	CCS	%GORD.	PSIC.
Regiões	1	2,002 [*]	108,3 ^{**}	1178,1 ^{**}	567235,0 ^{**}	90,1 ^{**}	10982,5 ^{ns}	1,657 ^{**}	28837441,6 ^{**}
Erro Exp.	118	0,336	2,4	135,1	4540,7	2,2	8333,9	0,155	113014,3
Coef. Var. %		4,01	2,04	2,17	32,71	27,73	22,84	10,80	68,37

^{ns} – não significativo

^{*} - significativo ao nível de 95% de probabilidade

^{**} - significativo ao nível de 99% de probabilidade

CRIOSC. – Crioscopia

REDUT. – Redutase

TEMP. – Temperatura

CCS – Contagem de células somáticas

% GORD. – Porcentagem de gordura

PSIC. – Contagem de microrganismos psicrotróficos

A análise de variância detectou diferenças estatisticamente significativas para todas as variáveis estudadas, com exceção da CCS.

Os resultados do teste de Tukey para a comparação das médias entre as duas regiões, para as variáveis analisadas são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS DUAS REGIÕES ESTUDADAS PARA ACIDEZ, ÁLCOOL, CRIOSCOPIA, REDUTASE, TEMPERATURA, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, PORCENTAGEM DE GORDURA E PSICROTRÓFICOS

REGIÕES	MÉDIAS							
	ACIDEZ	ÁLCOOL	CRIOOSC.	REDUT.	TEMP.	CCS	%GORD.	PSIC.
Região 1	14,35 b	78,36 a	-0,540 a	274,75 a	6,26 a	409.283 a	3,53b	1,46 X 10 ⁶ b
Região 2	14,60 a	76,46 b	-0,533 b	137,23 b	4,53 b	390.150 a	3,76 ^a	9,81 X 10 ⁸ a

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade

Durante o experimento, o leite que apresentava resultado positivo para **análise de resíduo de antibiótico** foi imediatamente descartado pelo Encarregado do Serviço de Inspeção Federal (SIF), que é permanente nesta empresa, e por este motivo não foram realizadas as demais análises e nem realizadas as análises estatísticas para estas amostras, uma vez que este leite não foi processado. Durante o período de coleta das amostras da primeira fase, apenas dois tanques de caminhões apresentaram resultados positivos para esta prova, o que foi considerado um nível baixo de perda por resíduo de antibiótico. Os produtores que fornecem leite para este laticínio encontram-se bem informados quanto ao não envio de leite de animais que estejam sendo tratados com antibioticoterapia. A presença de resíduos de antibióticos no leite tem sido nos últimos anos, um dos maiores desafios impostos à indústria de alimentos no mundo, pois eles interferem na fabricação de alguns produtos lácteos, e são considerados indesejáveis pelos consumidores (FONSECA e SANTOS, 2000).

As médias encontradas para a **análise de acidez** neste experimento foram de 14,35°D (Região 1) e 14,61°D (Região 2) conforme mostra a Tabela 2, mesmo existindo diferença estatística entre as duas regiões de captação, esta não foi considerada, pois os valores encontrados estão dentro da variação permitida pela lei vigente para recebimento de leite cru (IN 51). Segundo a IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002) a acidez do leite, no momento da recepção, pode apresentar uma variação entre 14 e 18°D (ou 0,14 a 0,18g ácido láctico/100mL). De acordo com GOUNOT (1986) valores de acidez dentro da legislação indicam que o leite coletado possui baixa carga de microrganismos mesófilos e

que este leite foi transportado sob refrigeração adequada, pois são os microrganismos mesófilos presentes no leite que sob temperatura inadequada de transporte transformam a lactose do leite no ácido láctico que é medido nesta prova de acidez.

As temperaturas que permitiriam um desenvolvimento ótimo dos microrganismos mesófilos, entre 20 e 45°C, estão bem acima das temperaturas de refrigeração utilizadas durante o armazenamento nas granjas leiteiras. Os índices encontrados neste estudo indicam que o leite coletado durante o período de seca nas regiões de Curitiba e Alto Vale de Santa Catarina a partir da implementação da IN 51 são valores considerados próximos ao limite inferior estipulado para a acidez. SILVA (2004) estudando leite cru em São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás relatou que os resultados para análise de acidez apresentaram baixa amplitude de variação nos meses de seca com as médias entre 14 e 18°D. VIEIRA *et al.*(2003) relataram valores médios para acidez de 16,3°D em leite cru proveniente da Região de Castanhal no Pará, e NASCIMENTO *et al.*(2004) encontraram valores de acidez entre 19 e 20°D para o leite em Sergipe. Ambas as regiões onde a refrigeração desde a ordenha não é ainda obrigatória.

Nas regiões de captação de leite investigadas neste trabalho, a refrigeração tem sido implementada sistematicamente nas granjas a partir da ordenha desde o ano de 2002, provavelmente levando a valores mais baixos de acidez que os encontrados por SÁ (2004) em outras regiões no estado de Santa Catarina, com índices entre 16°D a 26,5°D. É possível perceber através da comparação com os outros autores citados que o leite recebido neste laticínio possui ótima qualidade quanto as análises de acidez, e que a matéria-prima em estudo atende a legislação vigente demonstrando que condições básicas para o controle dos mesófilos estão sendo tomadas, bem como cuidados com a refrigeração durante toda a etapa do processo de transporte tornando a matéria-prima mais propensa a resistir tratamentos térmicos uma vez que a baixa acidez é indicativo de qualidade microbiológica adequada e maior resistência ao calor (AFONSO e VIANNI, 1995).

A análise estatística dos valores obtidos na prova de **estabilidade térmica ao álcool** revelam diferença significativa nas médias entre as Regiões 1 e 2. Os valores de 78,36°GL da Região 1 e de 76,46°GL para a Região 2 encontram-se em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2002), o mínimo considerado estável que é de 72°GL.

Portanto, sendo consideradas as diferenças entre o valor e de, os resultados revelam que os leites recebidos apresentam boa estabilidade ao tratamento térmico.

Os resultados desta prova no Brasil são utilizados pelos laticínios para determinar o destino do leite na produção de derivados lácteos. Apesar da legislação vigente exigir 72°GL, diversas indústrias estão utilizando padrões mínimos acima de 78°GL para a aceitação da matéria prima (COSTA *et al.*, 2004). A Região 2 possui um leite com menor estabilidade térmica, provavelmente resultado do longo período de tempo desde a ordenha até o seu recebimento na indústria e o valor de 76,46°GL neste trabalho apresenta-se bastante próximo do valor considerado mínimo aceitável nesta indústria que é de 76°GL. PIEN (1972), citado por SHEW (1981), sugeriu que, para fins de produção do leite UHT, o leite cru deve resistir, no mínimo, ao álcool com graduação de 74°GL para tentar garantir uma melhor qualidade do produto após processado e uma vida de prateleira adequada diminuindo desta forma a ocorrência de geleificação e sedimentação neste produto. Em condição semelhante de captação, SILVA (2004) encontrou para o estado do Rio Grande do Sul o valor 76,7°GL para os meses de seca e de 79°GL para o estado de Goiás no mesmo período. A Região 1 apesar de apresentar um resultado mais próximo dos índices encontrados para o Estado de Goiás sugere a possibilidade de melhora nos valores de estabilidade ao etanol, por melhoria nas condições de manejo.

Ultimamente tem-se verificado com certa frequência, positividade de certos leites não ácidos na prova do álcool, uma possível causa da alteração na estabilidade do leite ao etanol poderia ser o desenvolvimento de bactérias psicotróficas com a concomitante produção de proteases (ARCURI *et al.*, 2004). Como veremos mais adiante, as bactérias psicotróficas são também incriminadas em várias outras alterações da matéria-prima e dos produtos processados de leite e seus derivados além das alterações na análise de estabilidade ao álcool, causando muitos transtornos e preocupações as pessoas envolvidas no setor leiteiro.

O **ponto crioscópico** do leite apresentou diferenças estatísticas significativas entre as médias das duas regiões. Os valores de -0,540°H para a Região 1 e -0,533°H para Região 2 encontram-se dentro da variação permitida pela legislação vigente. Na legislação, conforme IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002), o valor da crioscopia do leite deve

estar entre $-0,540 \pm 0,01^{\circ}\text{H}$. Este valor depende de uma série de fatores relacionados ao animal, ao leite, ao ambiente, ao processamento e às técnicas crioscópicas, resultando em dificuldades para o estabelecimento de padrões crioscópicos (SILVA, 2004).

Os valores de crioscopia encontrados neste trabalho corroboram com os valores de $-0,540^{\circ}\text{H}$ para a estação seca nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás por SILVA (2004). Esse autor comenta que diferenças nos resultados crioscópicos possam resultar de condições de manejo, alimentação e de raças bovinas que afetam os sólidos do leite. LORENZETTI *et al.* (2005) analisando leite produzido na região metropolitana de Curitiba também encontrou em todas as amostras analisadas de acordo com a legislação vigente, uma média de crioscopia de $-0,550^{\circ}\text{H}$. NASCIMENTO *et al.* (2004) estudando qualidade de leite cru no estado de Sergipe encontrou valores de ponto crioscópico de $-0,549^{\circ}\text{H}$ a $-0,513^{\circ}\text{H}$. Embora o problema de crioscopia possa indicar fraude, alguns pesquisadores acreditam que a fase da lactação, estação do ano, clima, latitude, alimentação e mesmo a raça do animal possam influenciar diretamente o ponto de congelamento do leite. O SIF não permite a utilização do leite que apresente crioscopia fora dos padrões pressupondo fraude.

A determinação de fraude no leite por adição de água é a aplicação mais usual da crioscopia em laticínios, em razão da diminuição do valor nutricional, do aumento dos custos de transporte e da energia empregada no processamento, da queda de rendimento na fabricação de derivados e da contribuição para contaminação microbiana (GUIMARÃES, 1998). Neste trabalho foi possível verificar através dos valores das médias apresentadas para análise de crioscopia que o leite recebido pelo laticínio não apresenta problemas relacionados a fraudes com adição de água por parte dos produtores e/ou transportadores do leite recebido. A crioscopia também é útil em programas de gerenciamento de qualidade do processamento do leite e derivados.

Os resultados encontrados para a **prova de redutase** entre as duas regiões avaliadas neste estudo, resultaram em diferenças importantes entre as médias o que demonstrou grande contraste na qualidade do leite. Esta análise é considerada como uma forma indireta de medir microrganismos mesófilos presente na matéria-prima. Conforme mostrado na Tabela 2, é possível observar que o tempo de prova de redutase da Região 1 de 274,8 minutos, foi exatamente o dobro da redutase encontrada para a

Região 2 que foi de 137,2 minutos. A redutase mínima exigida pela legislação é de 90 minutos, em ambas as regiões a média foi superior a este tempo. Portanto é possível verificar que o leite proveniente das duas regiões de captação apresentam resultados que atendem a legislação vigente e que a carga de microrganismos mesófilos está controlada nessas regiões, mas as análises demonstraram que a Região 1 possui um leite de qualidade microbiológica superior, pois como já foi dito o tempo de redutase é uma forma indireta de medir a contagem de microrganismos mesófilos de modo que as bactérias em desenvolvimento consomem o oxigênio presente no leite e abaixam o potencial de oxidação até um ponto em que ocorre o descolorimento do azul de metileno, de azul para incolor.

A grande diferença encontrada nesta análise entre as duas regiões provavelmente ocorreu devido à própria forma de captação deste leite e da maneira com que ele é transportado até seu destino final, pois a quantidade de microrganismos no leite está relacionada com a limpeza dos utensílios utilizados para retirada deste leite na propriedade leiteira e na forma de transporte. Na Região 1 o leite é captado diariamente nas granjas leiteiras e é transportado diretamente até o laticínio com um tempo de ordenha e transporte relativamente menor. Na Região 2 o leite é encaminhado a um entreposto de resfriamento após ser captado nas granjas leiteiras, posteriormente é carregado em caminhões tanques de maior porte e, finalmente transportado até seu destino final. O leite da Região 2 chega até a indústria com um tempo de ordenha e transporte maior que o leite da Região 1, e esse tempo maior de ordenha e transporte, somado as oscilações de temperatura enfrentadas entre um carregamento e outro, as passagens por silos de estocagem no entreposto de resfriamento e tanques de carretas diferentes, tornam esse leite mais susceptível a contaminações microbiológicas e favorecem o desenvolvimento da microbiota mesofílica já presente no leite.

Os resultados encontrados neste trabalho para a análise de **medição da temperatura** do leite cru revelaram diferenças estatísticas significativas entre as duas regiões estudadas. A temperatura do leite da Região 1 apresentou valor superior ($6,26^{\circ}\text{C}$) a temperatura do leite da Região 2 ($4,53^{\circ}\text{C}$). Conforme BRASIL (2002), no momento do recebimento na indústria beneficiadora a temperatura do leite cru deve ser igual ou inferior a 7°C , portanto o leite analisado para as duas regiões atende a legislação vigente.

A diferença encontrada entre as duas regiões para esta análise ocorreu provavelmente, como na análise de redutase, devido às diferenças nas condições de captação e transporte até a unidade beneficiadora. Na Região 1 o leite é recolhido das granjas leiteiras e encaminhado até a fábrica diretamente, portanto não passa por adicional resfriamento além do que já sofreu nos tanques de resfriamento de expansão ou imersão (obrigatórios por lei) presentes na própria granja leiteira. Na Região 2 temos o leite recolhido nas granjas leiteiras, sendo encaminhado para um entreposto de resfriamento onde passará por um novo resfriamento em um resfriador a placas onde o leite deve chegar a temperaturas entre 1 e 2°C, sendo posteriormente encaminhado à unidade beneficiadora. Desta forma o leite da Região 2 chega com temperatura menor à fábrica, uma vez que passa por um segundo resfriamento antes de chegar a fábrica beneficiadora.

Embora a legislação vigente estabeleça como valor uma temperatura de 7°C ou menos, o ideal segundo SANTOS e FONSECA (2003) é que a temperatura do leite durante o transporte permaneça abaixo dos 5°C, pois resfriamentos marginais (entre 5 e 10°C) promovem uma alteração quantitativa e qualitativa na microbiota do leite, selecionando desta forma microrganismos psicrótrófos, que não são desejados uma vez que podem causar muitos prejuízos na própria matéria-prima e ao leite após processado.

A temperatura em que o leite chega até a unidade beneficiadora é de extrema importância durante todo o processo em um laticínio, pois temperaturas de resfriamento que não se encontram abaixo de 5°C prejudicam e diminuem a qualidade do leite causando prejuízos que são irreparáveis (FONSECA e SANTOS, 2000). Este leite com menor qualidade será posteriormente transformado em produtos lácteos que poderão vir a apresentar problemas durante o seu processamento como por exemplo, problemas de formação de coágulos em fermentados e massas de requeijão ou mesmo diminuição da vida de prateleira.

Conforme observado na Tabela 2 nas análises realizadas para **CCS** os dados obtidos revelaram que não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as duas regiões. A legislação vigente para leite cru (BRASIL, 2002), exige que as CCS de leite de conjunto não sejam superiores a 1.000.000 de células por mL. As médias encontradas para contagem de células somáticas para o leite recebido neste laticínio

foram de 409.000 céls./mL para Região 1 e de 390.200 céls./mL para Região 2. Esses resultados encontram-se abaixo dos limites máximos, demonstrando que a empresa atende a este quesito da legislação. Desta forma, o leite analisado indica adequado controle de mastite nas propriedades leiteiras pesquisadas, uma vez que a CCS é utilizada para designar todas as células presentes no leite, que incluem as células de origem do sangue (leucócitos) e células de descamação do epitélio glandular que aumentam muito quando o animal apresenta inflamação na glândula mamária (NATZKE, 1981).

Os valores das médias para CCS encontradas neste trabalho são próximas às médias de países como Canadá onde o máximo permitido são 500.000 céls./mL de leite. Esta variável depende do trabalho dos técnicos de campo do laticínio e é possível afirmar ainda que do ponto de vista econômico, os produtores que fornecem leite a este laticínio não estão sofrendo grandes perdas na produção, pois a presença de altas contagens de células somáticas indica animais com mastite que podem ter sua produção diminuída em relação aos animais sadios.

As médias das Regiões 1 e 2 são menores que as médias relatadas por NEVES *et al.* (2004) que estudando CCS em algumas regiões do estado de Minas Gerais, encontrou médias de 600.205 céls./mL para a região Metalúrgica, 552.667 para a região Centro Oeste e 555.094 céls./mL na região Sul do estado de Minas Gerais. Os estudos de MACHADO *et al.* (1999) apresentaram valor médio de 641.000 céls./mL analisando amostras de leite de tanques de expansão. Já BUENO *et al.* (2004) obtiveram médias de 348.000 céls./mL. no estado de Goiás. SILVA (2004), também encontrou valores inferiores as médias deste trabalho ao analisar leite de bovinos no estado de Goiás, média de 226.000 céls./mL nos meses de seca e 233.000 céls./mL nos meses chuvosos. O leite destas duas regiões estudadas apresenta boas contagens para CCS que provavelmente ainda podem ser reduzidas.

Recomendações para níveis aceitáveis de contagens de células somáticas (CCS) não são atualmente especificados no Codex. E não existem regulamentações para a CCS do leite no comércio internacional. Entretanto, antecipando-se as recomendações do Codex que serão implementadas, muitos países têm adotado limites máximos de CCS como parte dos seus padrões nacionais de regulamentação para assegurar a higiene do

leite. Estes limites reguladores de CCS são adotados tanto para o leite importado como para o leite produzido no mercado doméstico. Estes países têm aceitado as evidências científicas que a CCS do tanque de leite é uma medida de qualidade do leite associada com a saúde humana e a qualidade e utilidade do leite produzido (GODKIN, 2000). Países com grandes mercados exportadores para leite e produtos lácteos, tais como Nova Zelândia e Austrália, têm adotado limites superiores de CCS de 400.000 céls/mL. Entretanto, dentro do Mercado Comum Europeu, alguns países como a Suécia têm caminhado a passos largos no sentido de exigir que todos os rebanhos apresentem CCS inferior a 250.000 céls/mL. O Canadá, onde a produção de leite é dependente da demanda pela indústria, têm limite exigido de 500.000 céls/mL. O atual limite máximo nos Estados Unidos é de 750.000 céls/mL, embora haja discussão sobre a possibilidade de redução destes limites para 400.000 céls/mL (GODKIN, 2000). No Brasil só a partir de 2002 com a publicação da IN 51 do MAPA estabeleceu-se o limite máximo de 1.000.000 céls./mL.

Os resultados encontrados para **porcentagem de gordura** nas duas regiões revelaram que existem diferenças estatísticas significativas entre as médias de 3,53% para Região 1 e 3,76% para Região 2. Essas médias encontram-se dentro dos valores aceitos pela legislação, apesar de serem estatisticamente diferentes. Na legislação para leite cru refrigerado (BRASIL, 2002) o teor de matéria gorda original no leite recebido na plataforma deve ser de no mínimo 3,0%. As médias encontradas para o teor de gordura das duas regiões neste trabalho encontram-se muito próximas das encontradas por BUENO *et al.* (2004), que encontraram média de 3,73% analisando amostras de leite cru em um extenso trabalho estudando leite cru no estado de Goiás e por FONSECA *et al.* (2004) estudando a composição de leite cru no estado de Minas Gerais, encontrou média de 3,63%. Segundo FONSECA e SANTOS (2000), as médias de gordura podem sofrer pequenas variações dentro de um mesmo rebanho quando levamos em consideração a raça dos animais e dietas variadas, e a pequena diferença encontrada entre as médias de teores de gordura entre as duas regiões pode ter ocorrido justamente em função destas duas variáveis: rebanhos distintos e alimentação diferenciada já que vegetação, manejo e rebanhos podem ser distintos por tratarem-se de regiões diferentes.

Variações nos teores de gordura tanto superiores quanto inferiores a 3% foram encontrados por WALSTRA e JENNESS (1984), PONCE *et al.* (1999) e SÁ (2004), inclusive com sugestão da ocorrência de fraude em algumas das amostras analisadas. Essas fraudes de desnate do leite nas propriedades são freqüentes, mas podem ser detectadas por um sistema de análise físico-química, como a análise de gordura, por exemplo.

Na recepção do leite o principal objetivo de se realizar esta análise é o pagamento do produtor pela quantia de gordura presente (maior o percentual de gordura, maior o bônus no pagamento) e a verificação de padrão mínimo de gordura exigido pela legislação. No leite já pasteurizado e padronizado, o principal objetivo de realizarmos a análise de gordura é a detecção de fraude quanto ao teor de gordura indicado no rótulo, uma vez que esta matéria gorda excedente constituirá parte dos derivados de leite, tais como creme de leite pasteurizado (nata), creme de leite UHT e manteiga (LORENZETTI *et al.*, 2005). Mas a porcentagem de gordura no leite cru é diretamente afetada por mudanças na dieta, e nem sempre quando se constata uma baixa na média dos valores de gordura do leite de uma determinada região pode se afirmar que resulta de fraude. A época do ano influencia sobre o tipo de pastagens e a dieta oferecida aos animais em lactação, devido a isso são esperadas algumas variações naturais na porcentagem desse elemento no leite. Animais de alta produção também tendem a enfrentar problemas quanto a porcentagens de sólidos no leite ordenhado, muitas vezes vacas da raça Holandesa de alta performance, possuem grandes volumes ordenhados durante a fase de lactação mas os sólidos em geral presentes no leite, como a gordura por exemplo, podem apresentar-se abaixo dos valores mínimos exigidos pela legislação (SANTOS e FONSECA, 2003).

As análises estatísticas para **contagem de microrganismos psicrotróficos** revelaram diferenças estatísticas significativas para as duas regiões no momento da recepção da matéria prima na plataforma de leite cru. Na Tabela 2 é possível verificar que a média da Região 2 ($9,81 \times 10^8$ UFC/mL) é superior a média da Região 1 ($1,46 \times 10^6$ UFC/mL). Mesmo não existindo uma legislação específica para contagem de microrganismos psicrotróficos no Brasil, a legislação vigente possui como contagem

bacteriana máxima permitida o valor de 10^6 UFC/mL (BRASIL, 2002), o que demonstra que ambas as médias encontram-se em desacordo com a legislação.

Como ocorreu na prova de redutase e na medição da temperatura, a possível causa para a diferença encontrada entre as médias das duas regiões para esta prova esteja relacionada a maneira de captação e transporte do leite cru até o laticínio. O leite da Região 2 passa por um entreposto de resfriamento antes de ser transportado até a unidade beneficiadora e chega até o seu destino com mais de 72 horas após ter sido ordenhado. Desta forma, a multiplicação de microrganismos psicrotróficos após muitas horas sob temperatura de resfriamento, em torno de 4 a 7°C, torna-se intensa (SANTOS e FONSECA, 2003; MUIR, 1996). Já o leite da Região 1 após ser captado nas granjas leiteiras é diretamente enviado até a indústria, fazendo com que este leite seja recebido na unidade beneficiadora com um tempo após a ordenha entre 24 a 48 horas. Embora também se encontre em desacordo com a legislação vigente, o leite captado na Região 1 obteve valores de contagens inferiores aos da Região 2 demonstrando portanto uma qualidade microbiológica superior.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores que estudavam a multiplicação desses microrganismos em leite cru submetido ao armazenamento em temperatura de resfriamento. PINTO *et al.* (2004) utilizando estirpes de *Pseudomonas fluorescens* e com inóculo inicial de 10^4 UFC/mL em leite mantido nas temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C obtiveram contaminações de 10^5 UFC/mL, 10^6 UFC/mL e 10^7 UFC/mL. Evidenciando que uma contaminação da ordem de 10^4 UFC/mL pode colocar o leite *in natura* em desacordo com a legislação brasileira (máximo de 1.000.000 de bactérias/mL de leite). JASPE *et al.*, (1995) relataram que o gênero *Pseudomonas*, após submetido a incubação em baixas temperaturas (7°C) durante o período de 3 dias, apresenta atividade proteolítica cerca de 1000 vezes maior, atividade lipolítica cerca de 280 vezes maior e taxa de crescimento aproximadamente 10 vezes superior, quando comparadas com amostras que não sofreram tal período de incubação. Estes resultados indicam que o gênero *Pseudomonas*, apresenta alto potencial de deterioração dos componentes do leite quando submetido a prolongados períodos de refrigeração. SHAH (1994) relatou que a atividade enzimática dos psicrotróficos tem grande importância quando as contagens ultrapassam 10^6 UFC/mL, demonstrando que os valores

encontrados neste trabalho são preocupantes do ponto de vista desta análise, e que o leite pode encontrar-se prejudicada já no momento da chegada na indústria.

ADAMS *et al.*, (1975) citaram que bactérias psicrotróficas na quantidade de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL podem produzir enzimas termoestáveis responsáveis por cheiro e sabor desagradáveis e coagulação do produto, reduzindo a vida útil do mesmo. FEIJÓ *et al.* (2002), utilizando leite proveniente de caminhões de coleta a granel também relatou elevadas contagens de psicrotróficos como as encontradas neste trabalho, variando de $1,1 \times 10^4$ UFC/mL a $3,9 \times 10^7$ UFC/mL. Afirmou que estes resultados são preocupantes, pois quando o número de psicrotróficos atinge contagens superiores a 10^6 UFC/mL, poderá ocorrer a produção de enzimas termorresistentes, responsáveis por alterações como a gelatinização do leite UHT, além do desenvolvimento de sabor residual no leite pasteurizado. Uma característica desejável para a garantia de qualidade na indústria de laticínios moderna é a habilidade de prever rapidamente a vida de prateleira dos seus produtos finais, assim como avaliar a qualidade da matéria-prima recebida em tempo hábil para a tomada de medidas corretivas no seu processamento. Grande parte dos testes de predição de vida de prateleira de produtos lácteos são baseados na detecção de psicrotróficos, pois estes microrganismos e suas enzimas são também os principais causadores da redução da vida de prateleira destes produtos (WHITE, 1993).

As médias encontradas nas análises de contagem de microrganismos psicrotróficos neste trabalho são preocupantes, pois mesmo a menor média encontra-se acima dos valores mínimos citados na literatura por ADAMS *et al.* (1975) para que se tenham grandes possibilidades da presença de enzimas degradativas extracelulares termorresistentes produzidas por estes microrganismos.

5.2 TEMPERATURA x TEMPO DE ESTOCAGEM

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados da variável avaliada e os valores de qui-quadrado (χ^2) referentes ao teste de Bartlett.

TABELA 3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS ANALISADOS TEMPO X TEMPERATURA DE ESTOCAGEM

FORTE DE VARIAÇÃO	G. L.	QUADRADOS MÉDIOS
CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS		
FATOR A (região)	1	2022972,262 ^{**}
FATOR B (temperatura)	2	499631,072 ^{**}
INTERAÇÃO AB	2	405362,845 ^{**}
FATOR C (tempo)	3	120706,711 ^{**}
INTERAÇÃO AC	3	105821,314 ^{**}
INTERAÇÃO BC	6	59814,036 ^{**}
INTERAÇÃO ABC	6	63570,434 ^{**}
ERRO	48	500,554
COEFICIENTE DE VARIANÇÃO (%)	11,80	
QUI-QUADRADO (χ^2)	34,042 ^{ns}	

^{ns} – não significativo

* - significativo ao nível de 95% de probabilidade

** - significativo ao nível de 99% de probabilidade

Na Tabela 3 pode se verificar que para a variável estudada, a interação dos fatores A, B e C foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$), indicando que seus efeitos não são independentes.

Os resultados do teste de Tukey para a comparação das médias para a variável analisada são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 4 – RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES DAS MÉDIAS DA VARIÁVEL X (UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS POR ML) QUANDO SUBMETIDAS À INTERAÇÃO DOS FATORES C (TEMPO) E B (TEMPERATURA) PARA A REGIÃO 1 (CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA)

FATOR TEMPO DE ESTOCAGEM	FATOR TEMPERATURA DE ESTOCAGEM		
	1°C	3°C	6°C
0h	$1,7 \times 10^7$ b	$6,2 \times 10^5$ a	$2,4 \times 10^7$ a
4h	$2,1 \times 10^7$ b	$2,8 \times 10^6$ a	$9,9 \times 10^6$ a
20h	$7,0 \times 10^7$ a	$5,6 \times 10^6$ a	$1,4 \times 10^7$ a
36h	$5,2 \times 10^7$ ab	$1,5 \times 10^6$ a	$2,9 \times 10^7$ a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas Tabelas 4 e 5, as contagens de microrganismos psicrotróficos no momento da chegada das carretas ao laticínio estão representadas no tempo inicial (tempo zero) de estocagem. Os valores na contagem de microrganismos psicrotróficos já se mostram bastante elevados e como foi dito anteriormente na primeira etapa, embora não exista uma legislação específica para estes microrganismos, a legislação vigente estabelece o número máximo de 10^6 UFC/mL para contagem bacteriana, o que permite afirmar que este leite já apresenta-se em desacordo com a legislação no ato da sua chegada na plataforma de recepção. Uma explicação provável para a elevada contagem desses microrganismos é que com o uso intensificado da refrigeração nas propriedades produtoras de leite, estimula-se a seleção de microrganismos psicrotróficos. Na maioria das propriedades leiteiras os equipamentos mantêm a temperatura de refrigeração entre 5 a 10°C, o que configura um “resfriamento marginal do leite” contribuindo para a multiplicação de microrganismos psicrotróficos (FONSECA e SANTOS, 2000). Somando-se ao possível resfriamento marginal nas propriedades, o período de tempo entre a ordenha e a chegada desta matéria-prima na unidade beneficiadora, de 24 a 48 horas para Região 1 e superior a 72 horas para Região 2, ambos bastante longos. Além disso, existe a temperatura de transporte nas carretas, de 6,26°C e 4,53°C para as Regiões 1 e 2. Os dois fatores relacionados ao transporte, temperatura e sua duração, podem ser parcialmente responsáveis por estas altas contagens iniciais. Embora não tenha sido estabelecido os valores iniciais para os microrganismos psicrotróficos imediatamente após a ordenha neste trabalho, DESAMASURES e GUEGUEN (1997) estudando microrganismos psicrotróficos na superfície dos tetos de vacas recém ordenhadas já encontraram altas contagens como $2,1 \times 10^4$ UFC/mL e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL. GOMES (1988) obteve resultados médios de $4,8 \times 10^4$ UFC/mL quando o leite encontrava-se ainda nas granjas leiteiras. Os resultados encontrados por esses autores reforçam a idéia de que se um controle inicial nas próprias granjas leiteiras não for realizado, o leite sofrerá prejuízos na qualidade mesmo estando sobre refrigeração.

Na Tabela 4, na comparação das médias entre os tempos de estocagem (4, 20 e 36 horas) em relação às temperaturas de 3°C e 6°C, observamos que não houveram diferenças estatísticas. O comportamento da variável número de microrganismos psicrotróficos foi não significativo nos tempos de estocagem de 4, 20 e 36 horas para

essas duas temperaturas. Os períodos de estocagem em relação a temperatura de 1°C na Região 1 apresentam diferenças estatísticas entre os tempos 4 e 20 horas, onde observa-se um maior crescimento de microrganismos psicrótrófos. Analisando ainda a temperatura de 1°C dentro da Região 1 verificamos que entre os tempos 20 e 36 horas de estocagem houve um decréscimo na contagem desses microrganismos, assim como no mesmo período para a temperatura de 3°C. As contagens bacterianas foram efetuadas em placas de petrífilm onde foi contado o número de colônias que se desenvolveram, a diminuição na contagem pode ser resultado da menor capacidade dessas bactérias poderem desenvolver suas colônias após muito tempo de permanência em temperaturas muito baixas que possivelmente inibiram o seu desenvolvimento. O crescimento populacional dos psicrótrófos continuou mesmo nas três temperaturas de refrigeração estudadas, e como os valores iniciais são considerados muito elevados, o menor tempo de estocagem no laticínio parece ser adequado. SANTOS e FONSECA (2003) citam que os microrganismos psicrótrófos em condições de refrigeração, mantêm sua capacidade de multiplicação e tendem a se tornar predominantes na microbiota do leite cru após 2 a 3 dias nessas condições.

TABELA 5 – RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES DAS MÉDIAS DA VARIÁVEL X (UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS POR ML) QUANDO SUBMETIDAS À INTERAÇÃO DOS FATORES C (TEMPO) E B (TEMPERATURA) PARA A REGIÃO 2 (ALTO VALE DE SANTA CATARINA)

FATOR TEMPO DE ESTOCAGEM	FATOR TEMPERATURA DE ESTOCAGEM		
	1°C	3°C	6°C
0h	2,4 x 10 ⁸ d	1,9 x 10 ⁷ a	2,3 x 10 ⁸ d
4h	8,2 x 10 ⁸ a	3,3 x 10 ⁷ ab	3,7 x 10 ⁸ c
20h	4,3 x 10 ⁸ c	4,1 x 10 ⁷ ab	4,8 x 10 ⁸ b
36h	6,1 x 10 ⁸ b	6,9 x 10 ⁷ b	9,4 x 10 ⁸ a

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5, na comparação das médias entre os tempos de estocagem (4, 20 e 36 horas) em relação às temperaturas de 1, 3 e 6°C, observamos que houveram diferenças estatísticas, principalmente entre os diferentes períodos de estocagem nas temperaturas de 1°C e 6 °C. Para o leite estocado a 3°C as diferenças estatísticas

ocorreram apenas entre o tempo inicial e o tempo de 36 horas. Na Tabela 5 é possível observar ainda que entre os valores iniciais e os valores após 36 horas de estocagem, os microrganismos psicotróficos continuam a crescer, com um crescimento um pouco mais acentuado nas temperaturas de 3°C e 6°C, respectivamente.

Uma parte da grande variabilidade dos resultados pode ser atribuída ao modo como foi realizado o experimento, uma vez que trata-se de leite vindo direto das propriedades leiteiras e como as amostras para as diferentes temperaturas não foram as mesmas, as contagens iniciais são diferentes e podem apresentar distintos grupos de microrganismos psicotróficos.

Ao considerarmos os aspectos biológicos, é possível afirmar que as horas de estocagem, independente da temperatura a que este leite seja submetido dentro do laticínio permitem a continuidade do crescimento populacional dos microrganismos psicotróficos e que um menor tempo de estocagem deve ser almejado como ideal, no caso deste laticínio estudado o menor tempo de estocagem possível é o de 4 horas. Tempo necessário para que ocorra o total descarregamento do leite cru da carreta, análises realizadas pelo laboratório e posterior encaminhamento desta matéria-prima para a pasteurização.

Isto nos permite sugerir que a refrigeração do leite cru, até a chegada na unidade beneficiadora, prevista na legislação (BRASIL, 2002) de no máximo 7°C, não é suficiente para a manutenção da qualidade microbiológica da matéria-prima dependendo de quanto tempo que este leite fique submetido a esta refrigeração e que a temperatura exigida pela legislação deveria ser inferior. Segundo PINTO *et al.* (2004), uma contaminação inicial elevada do leite pode promover o aumento da população para 10^8 UFC/mL a 10^9 UFC/mL conferindo prejuízos econômicos à indústria de laticínios, que como já discutido anteriormente, tornam a situação do leite que chega até este laticínio estudado com médias semelhantes as citadas por este autor, bastante preocupantes. Observou-se na Tabela 5 que, como ocorreu na Região 1, o desenvolvimento dos microrganismos psicotróficos foi crescente em todas as temperatura estudadas e que o tempo de estocagem de 4 horas deve ser adotado como ideal neste laticínio para ambas as regiões. É possível afirmar ainda que para a Região 2 a melhor temperatura de estocagem foi a temperatura de 1°C pois foi a que apresentou os menores crescimentos

quando comparada as demais temperaturas nos mesmos intervalos de tempo de estocagem. Diferente do que ocorreu na Região 1, obtivemos os menores crescimentos na menor temperatura de estocagem e os maiores crescimentos na maior temperatura a que o leite foi submetido, corroborando com alguns autores que citam que menores temperaturas de estocagem tendem a retardar o crescimento desses microrganismos. GRIFFITHS *et al.* (1987) observaram uma redução de 25% nas contagens de microrganismos psicrótrófos no leite cru, ao reduzirem a temperatura de refrigeração na estocagem de 6°C para 2°C, usando como referência o tempo. COSTA *et al.* (2002), estudando a espécie de microrganismos psicrótrófos *Pseudomonas fluorescens*, constataram aumento significativo na produção de proteases em leite estocado a 6°C após 72 horas, quando a concentração celular era de, aproximadamente, 10^7 UFC/mL. Esses autores observaram que após certo tempo de estocagem, cerca de 72 horas, já é possível encontrar quantidades razoáveis de enzimas no leite cru, o que torna preocupante os dados encontrados neste estudo para a matéria-prima deste laticínio. Os resultados deste trabalho confirmam os resultados encontrados por PINTO *et al.* (2004), que comprovaram que o leite mesmo sob refrigeração, permite o crescimento de microrganismos psicrótrófos. De acordo com SORHAUG e STEPANIAK (1997), um dos principais fatores que influenciam a qualidade da matéria-prima mantida a 7°C ou menos por períodos prolongados, é a multiplicação da microbiota psicrótrófica contaminante produtora de proteases termoestáveis.

É fundamental o esforço de toda a cadeia leiteira para tentar evitar o desenvolvimento de microrganismos psicrótrófos no leite cru destinado a produção de leite pasteurizado, leite UHT e derivados. As altas contagens de microrganismos psicrótrófos obtidas na matéria-prima durante a chegada neste trabalho, indicam que a implantação de um programa de granelização deve ser acompanhada de ações eficazes que evitem a contaminação do leite durante a produção na propriedade leiteira, estocagem refrigerada, coleta e transporte a granel. Em paralelo, a redução do tempo em que o leite é mantido refrigerado deve ser um objetivo a ser alcançado. Para isto, é necessário garantir boas condições higiênicas na ordenha e transporte e o menor tempo possível de manutenção do leite cru sob refrigeração entre a ordenha e o processamento.

6 CONCLUSÃO

- As análises de resistência frente ao álcool, redutase e contagem de microrganismos psicrotróficos apresentaram diferenças estatisticamente significativas e demonstraram que o leite captado na Região 1 é superior qualitativamente;
- Durante a estocagem do leite, observou-se que as contagens de microrganismos psicrotróficos aumentaram mesmo com o leite sob temperatura de refrigeração, sugerindo que um tempo mínimo de estocagem para a matéria-prima deve ser meta neste laticínio;
- O tempo de 4 horas de estocagem foi identificado como sendo o ideal para a matéria-prima deste laticínio para ambas as regiões estudadas;
- A temperatura de 1°C pode ser definida como ideal para minimizar o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos durante a estocagem para o leite captado na Região 2;
- Os resultados obtidos neste estudo revelaram ainda que as contagens iniciais de microrganismos psicrotróficos apresentaram-se altas no momento da chegada da matéria-prima na indústria beneficiadora, podendo resultar em sérios problemas nos produtos lácteos produzidos neste laticínio.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, Sanvov, v. 58, n. 6, p.828-834, 1975.

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 5 p. 823-827, 1976.

AFONSO, J. B. A.; VIANNI, M. C. E. Variação do teor de cloretos e acidez Dornic no leite de vacas com mastite induzida experimentalmente. **Revista Universidade Rural**, v. 17, n. 1, p.1-6, 1995.

ALMEIDA, A. A. P. **Anais do XV Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, vol. 53, n. 304, 1998, p-26-29.

ALVARES, J. G.; NOGUEIRA NETTO, V.; MARTINS, P. C.; BARROSO, M. Perspectivas para o cooperativismo de leite no Brasil. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; FERNANDES, E. N.; ZOCCAL, R.; MARTINS, M. C.; NOGUEIRA NETTO, V. **Gestão ambiental e políticas para o agronegócio do leite**. Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite; CNPq; Serrana Nutrição Animal, 2003. p. 59-80.

AMOURETTI, M. C. Cidades e campos gregos. In: FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. Tradução: Luciano Vieira Machado e Guilherme J. F. Teixeira. São Paulo: Estação Liberdade Ltda, 1998. p. 137-154.

ANDERSON, M. Milk lipases and flavor development. **Journal Society of Dairy Technology**, v. 36, 1983.

ANTUNES, V. C.; JUNIOR, W. M. S.; VALENTE, P. P.; BARROS, A. P.; CONDE, C. B. C.; ROSA, R.; BERTOLDI, M. C.; SARAIVA, C.; FERREIRA, C. L. L. F. Contagem Total de Microrganismos Mesófilos e de Psicrótróficos no Leite Cru e Pasteurizado, Transportado via Latão ou Granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 199, jul./ago. 2002.

ANVISA. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo** – PAM Vet. Brasília, novembro de 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br; Acessado em 10 de maio de 2004.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1995. p. 335.

ARCURI, E.F.; TAVARES, W. P. P.; PEREIRA, D. B. C.; BRITO, M. A. V. P. Efeito do crescimento de *Pseudomonas* sp. proteolítica na estabilidade de leite ao etanol. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios**, v. 59, n. 339, p.140-144, 2004.

BACHMAN, K. C. Managing milk composition. In: **Large Dairy Herd Management**, 1992. p. 336.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Estimation of potencial shelflife of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 48, p. 663-667, Aug. 1998.

BLOSSER, T. H. Economic losses from and the national research program on mastitis in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 369-388, 1979.

BORGES, M. F.; BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R. Efeito bactericida do peróxido de hidrogênio sobre *Salmonella* em leite destinado a fabricação de queijos. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 145-149, 1989.

BRASIL. Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, mel – PCRM, leite – PCRL e pescado – PCRP. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Instrução Normativa n.º 42, de 20 de dezembro de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 8-13, 20 de set. 2002. Seção I.

BRESCIANI, E. Alimentos e bebidas do antigo egipto. In: FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. Tradução: Luciano Vieira Machado e Guilherme J. F. Teixeira. São Paulo: Estação Liberdade Ltda, 1998. p. 68-79.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; OLIVEIRA, J. P. Contagem celular somática, contagem bacteriana total e composição centesimal do leite cru, refrigerado em tanques de expansão de uso individual, no estado de Goiás. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 417-420.

CANA BRAVA, H. A.; GÓMEZ, F. G.; LARREA, M. S. A. Antimicrobianos em Animais Produtores de Alimentos. **Revista ABCZ**. n º 6, janeiro, 2002.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, p. 59-63, 1996.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, jan. 1981.

COSTA, L. M.; GÓMEZ, M. F.; MOLINA, L. H.; ROMERO, A. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**.v. 52, n. 2, p. 1-13, 2002.

COUSIN, M. A. Presence and activity of Psychrotrophic bacteria in South East Queensland dairy products. **The Australian Journal of Dairy Techonology**. v. 37, p. 147, 1982.

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. **Journal of Dairy Technology. Australian**, v. 47, n. 1, p. 50-55, Jan. 1993.

CTENA, M. L. B.; PIROLI, M. **Leite Longa Vida: Indispensável na cozinha saudável**. São Paulo: Editora e Consultoria em Nutrição Ltda, 158 p.,1999.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicotróficas. **Indústria de laticínios**. Jul/ago, p. 71-73, 2000.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk – a review. **Institution Chemical of Engineers**, v. 79, p. 197-210, 2001.

DESAMASURES, N. & GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **Jounal of Dairy Research**. v. 64, p. 271-280, 1997.

ENGLERT, S. I. Avicultura: tudo sobre raças, manejo, alimentação e sanidade. **Revista Avicultura** 4. ed. Porto Alegre: Agropecuária Ltda, 1982.

FAGUNDES, M. C.; FISCHEN, V.; DA SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p.290-293.

FEIJÓ, L. D.; PINHEIRO, C. A.; SILVA, A. C. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENA, C. F. A. M. Caminhões de Coleta a Granel: Monitoramento da Qualidade do Leite, da Higienização do Mangote e da Superfície do Caminhão Tanque. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 285, jul./ago. 2002.

FLANDRIN, J. L. A alimentação camponesa na economia de subsistência. In: FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. Tradução: Luciano Vieira Machado e Guilherme J. F. Teixeira. São Paulo: Estação Liberdade Ltda, 1998. p. 580-610.

FONSECA, L.F.L. & SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**: Lemos Editora, 2000. 175p.

FONSECA, M.; RODRIGUES, R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; PENNA, C. M.; SOUZA, M. R.; FONSECA, C. S. P.; SOARES, C. F.; ALMEIDA, I. N. Contagem de células somáticas e composição de leite cru granelizado do estado de Minas Gerais. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 485-488.

FRANCO, A. **De caçador a Gourmet**. São Paulo: Editora SENAC, 2001. 217p.
FRANCO Jr., H. A idade média: nascimento do ocidente. 2º ed. São Paulo: Editora Brasiliense, 203p. 2001.

FURTADO, M. A. M.; VILELA, M. A. P.; MEURER, V. M.; BARBOSA, F. A. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 130-131.

GALTON, D. M.; PETERSON, L. G.; MERILL, W. G. Effects of premilking udder preparation practices on bacterial counts in milk and on teats. **Journal of Dairy Science**. v. 69, p. 260-266, 1986.

GILLIS, W. T. CARTLEDGE, M. F. ; RODRIGUES, I. R.; SUAREZ, E. J. Effect of raw milk quality on ultra high temperature processes milk. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 11, p.2875-2879, 1985.

GODKIN, A. II Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite. **Anais**. Curitiba, 2000, p. 9-16.

GOMES, M. I. F. V. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. **Piracicaba: ESALQ**, 1988. 85p.

GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederlands Melk em Zuiveltijds**, Chicago, n. 42, p. 1192-1197. 1986.

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Effect of low-temperature storage on the bacteriology quality of raw milk. **Food Microbiology**, v. 4, p. 285-291, 1987.

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 50, p. 289, 1981.

GUIMARÃES, J. A. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite. **Anais**, 1998, p. 95-153.

HARDING, F. Antibiotic testing in the United Kingdom, past and future. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 61, p. 283, 1993.

HARWALKAR, V. R. Age gelation of sterilized milks. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. London: Chapman & Hall, 1997. v. 1, p. 691-734.

HEERSCHEN, W. H. Residues of antibiotics and sulfonamides in milk: Significance and toxicological evaluation, legal situation within the European Community (EEC), and

method-related activities of the International Dairy Federation (IDF). **Buttetin of International Dairy Federation**, v. 3, 1993.

HOFFMANN, F. L.; CRUZ, C. H. G.; VINTURIM, T. M.; FAZIO, M. L. S. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C comercializado na região de São José do Rio Preto -SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 65, p. 51-54, 1999.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 273-284, 1992.

HUHN, S; HAJDENWURCEL, J. R.; MORAES, J. M.; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar a plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora , v. 35, n. 209, p.3-8, maio/jun. 1980.

IBGE (Rio de Janeiro, RJ). **Pesquisa pecuária municipal**. 2002. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de agosto de 2004.

ICMSF (Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos da IAMS (União Internacional das Sociedades de Microbiologia). **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS). **Microrganismos de los alimentos**. 1. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia. 1994. 804p.

JASPE, A.; OVIEDO, P.; FERNANDEZ, L. PALACIOS, P., SANJOSE, C. Cooling raw milk: change in the spoilage potencial of contaminating *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**. V. 58, p. 915-921, 1995.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5º ed. Chapman e Hall, New York, p. 328-336, 1996.

KITCHEN, B. J. Reviews of the progresso f dairy science: Milk compositional changes and related diagnostic testes. **Journal of Dairy Science**, v. 13, p. 217-223, 1991.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LANDISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 3275 – 3283, 1991.

LANARA. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. **Ministério da Agricultura Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária Laboratório Nacional de Referência Animal**. Brasília – DF, 1981.

LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. Piracicaba, **Revista Ciência Agrícola**, n. 3, p. 578-585, 1994.

LORENZETTI, D. K.; BAGGIO, E. C. R.; FONTOURA, P. S. G.; FREITAS, R. J. S. Avaliação Físico-Química de Leite Tipo C Comercializado em Curitiba e Região Metropolitana. **Revista Higiene Alimentar**. v. 138, 2005.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIÉS, G. A. Efeitos da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 10-16, ago. 1999.

MARTINS, M. C. Competitividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Revista de Política Agrícola**. Ano XIII. n. 3. p.38-51, 2004.

MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O.; VANETTI, M. C. D.; MEZÊNCIO, J. M. S.; Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 61, jul./ago. 2004.

MARTINS, M. L.; ARAÚJO, E. F.; MORAES, C. A.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Diversidade genética de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 58, p. 54-60, 2003.

McGREE, H. The science and lore of the kitchen, completely revised and updated. **On food and cooking**. New York: Scribner, 2004, 884p.

McKELLAR, R. C. Development of off-flavours in ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 11, p. 2138-2145, nov. 1981.

MONTANARI, M. Estrutura de produção e sistemas alimentares. In: FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. Tradução: Luciano Vieira Machado e Guilherme J. F. Teixeira. São Paulo: Estação Liberdade Ltda, 1998. p. 282-291.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos. **Revista Fazer Melhor**, v. 19, p.72-75, set/out. 2002.

MUIR, D. D. The shelf life of dairy products: factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 49, p. 24-32, 1996.

MUTUKUMIRA, A. N.; FERESU, S. B.; NARVHUS, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 9, p. 984-987, Sept. 1996.

NASCIMENTO, I. R.; CRUZ, V. R.; SÁ, C. O. Efeito do armazenamento e do transporte na qualidade do leite - Aquidabã/SE. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 283-286.

NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**. v. 64, p. 1431-1442. 1981.

NEVES, M. V. O.; NETO, L. G. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; REIS, S. R.; CORREA, J. A. N. Parâmetros físico-químicos e contagem de células somáticas de leite cru individual do estado de Minas Gerais – Brasil. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 239-242.

OLIVEIRA, J. S.; PARMELEE, C. E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 39, n. 4, p. 269-272, 1976.

PEREDA, J. A. **Tecnología de los alimentos** – volumen II: alimentos de origen animal. Espanha: Editorial Síntesis, 2005. p.75-78.

PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; SILVA, P. H. F. da. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora, 2000. 190p.

PEREIRA Jr., F. N.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; SÁ, M. J. S.; MACHADO, E. C.; AMADO, J. E. S. Comparação de métodos de enumeração de estimativa de microrganismos psicrófilos em leite cru e avaliação do teste Moseley. **Revista UFMG**. p. 14-32. 2002.

PICININ, L. C. A. Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais. **Dissertação de mestrado**. Belo Horizonte: UFMG, 2003.

PINTO, C. L. O.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Bactérias Psicrófilas Proteolíticas e Potencial Determinador a Temperaturas de Refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 110-117, jul./ago. 2004.

POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da Região de Marília – SP/Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 110, p. 56-63, jul. 2003.

PONCE, P.; CAPDEVILA, V. C.; LARANJA, L. F. Characterization of the Abnormal Milk Syndrome: an approach of its probable causes and its corrections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 195, 1999.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; LARA, J. A. F.; PIVA, F. C. Variação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação de qualidade. **Revista Higiene Alimentar**, v. 64, n. 98, p. 57-64, set. 1999.

PRZYSZYCHA, T.; SŁOJARZ, J. The effect of the way of milking on hygienic quality of milk on small farms in central Poland. **Annals of Warsaw Agricultural University Animal Science**, n. 35, p. 169-175, 2000.

RANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**. London, v. 20, n. 3, 1995. p. 517-524.

RIBAS, N. P. Programa de análise de rebanhos leiteiros. **Anais do I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite**. Curitiba, 1998, p. 58-67.

RICHTER, R. The effect of psychrotrophic bacteria on cheese manufacture. **American Dairy Review**, v. 41, p. 48-49, 1979.

ROQUE, R. A.; SCHUMACHER, S. S. P.; PAIVA, P. C. Quantificação de microrganismos psicrótróficos em leites pasteurizados tipos B e C, comercializados na cidade de São Paulo - SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 112, p. 59-68, set. 2003.

SÁ, E. Análises realizadas para o controle da qualidade de leite in natura de acordo com os parâmetros legais. **Revista Leite & Derivados**, ano XIV, n. 81, p. 67-72, nov./dez. 2004.

SANTANA, E. H. W. Contaminação do leite por microrganismos aeróbios mesófilos, psicrótróficos e psicrótróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira. 1v. 78p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina – Ciência Animal. nov, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrótróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v.19, p. 12-15, 2003.

SHAH, N. P. Psychrotrophic in milk: **a review**. *Milchwissenschaft*. v.49, p. 432-437, 1994.

SHEW, D. I. Technical aspects of quality assurance. In: International Dairy Federation. **New monograph on UHT milk**. Brussels, 1981. p. 115-121.

SILVA, E. O. T. R. Leite longa vida: avaliação de alguns parâmetros de qualidade dos leites cru e processado. 2001. 132p. **Tese Doutorado** – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, M. H. Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite. **Viçosa: UFV**, 1991. 104p.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1. ed. Juiz de Fora, 2004. 127p.

SILVA, P. H. F.; ABREU, L. R.; BRITO, J. R. F.; FURTADO, M. A. M. Variações regionais e sazonais na composição salina do leite. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 25-31.

SILVA, P. H. F. da; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 304, p. 157-163, jul/ago. 1998.

SILVA, P. H. F. da; TORRES, K. F. Acidez, pH e efeitos tampão no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 296, p. 33-41, nov./dez. 1995.

SILVA, P.H.F. da; PEREIRA, D.B.C.; COSTA JÚNIOR, L.C.G. **Físico-Química do Leite e Derivados Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráficas e Editora Ltda. 1997. p. 07-38.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de Microrganismos Psicrótróicos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

SOLER, J. As razões da Bíblia: regras alimentares hebraicas. In: FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. Tradução: Luciano Vieira Machado e Guilherme J. F. Teixeira. São Paulo: Estação Liberdade Ltda, 1998. p. 80-91.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 35-41, Feb. 1997.

STILWELL, G.; GONÇALVES, A. R. Antibióticoterapia Prática na clínica de Bovinos. **Congresso de Ciências Veterinárias**, outubro, 2002, p. 119-126.

STOFER, W.; HICKS, C. L. Pernicious psychrophiles – Their effect on cheese yield and composition. **Cultured Dairy Production Journal**, v. 18, p. 11-14, 1983.

SUHREN, G. Producer microorganisms. In: MCKELLER, R. G. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. CRC Press: Ranton, 310p. 1989.

SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 2801-2814, 1989.

SWAISGOOD, H. E.; BOSOGLU, F. Heat inactivation of the extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MC 50. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 32, p. 7, 1984.

TERNSTRON, A.; LINDBERG, A. M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v. 75, p. 25-34, jan. 1993.

TETRA PAK. **Leite – alimento versátil**. 2004. Disponível em: www.pratique.com.br
Acesso em: 29 de junho de 2005.

TINÔCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; BARCELLOS, R. M. C. Análise das condições físico-químicas do leite oferecido ao comércio em Viçosa – MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 98, p. 101-106, jul. 2002a.

TINÔCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; NOVATO, M. R. R.; BEZ, F.; BARCELLOS, R. M. C. Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 88-93, maio 2002b.

VIEIRA, L. C.; VEIGA, J. B.; FREITAS, C. M. K. H. Qualidade do leite na bacia leiteira de Castanhal: Resultados de pesquisas e recomendações. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.85, nov. 2003.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editora Acribia, 1984. 423p.

WEAVER, L. D. Antibiotic residues in milk and meat: Perceptions and realities. **Veterinary Medicine**, p. 1222-1228, 1992.

WHITE, C. H. Rapid methods for estimation and prediction of shelf-life of milk and dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3126-3132, 1993.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2085-2095, 2000.

WIKING, L.; FRIST, M. B.; LARSEN, L. B.; NIELSEN, J. H. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, n.4, p. 190-194, 2002.

ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteurization in milk plants. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 7, p. 1540-1544, july, 1981.

ZOCHE, F.; BERSOT, L. S.; BARCELLOS, V. C.; PARANHOS, J.K.; ROSA, S. T. M.; RAYMUNDO, N. K. Microbiological and physicalchemistry quality of pasteurized milks produced in the west region, Parana. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.